



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

L'Univercittà



Ministero dell'Università e della
Ricerca Scientifica e Tecnologica

Università degli Studi di Palermo

**Facoltà di Farmacia
Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche**

**DOTTORATO DI RICERCA
in
“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”
XXII CICLO, A.A. 2007/2008**

SSD CHIM/09

***SISTEMI NANOSTRUTTURATI POLIMERICI
PER LA VEICOLAZIONE ED IL RILASCIO DI FARMACI***

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

Dott. Girolamo Teresi

Tutor:

Ch.ma Prof.ssa Gennara Cavallaro

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Le Nanotecnologie	1
1.2 Nanomedicina	11
1.3 Micelle Polimeriche	23
1.4 Nanoparticelle Polimeriche	32
1.5 Nanosistemi in uso ed in sperimentazione clinica	44
	56
2. SCOPO DELLA TESI	
	65
3. RISULTATI E DISCUSSIONE (I PARTE)	
3.1 Sintesi dei copolimeri PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆	65
3.2 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆	70
3.3 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ contenenti Acido Ferulico	74
3.4 Stabilità delle micelle	80
3.5 Saggi biologici in vitro	83
3.6 Test emolitico	86
3.7 Preparazione di micelle contenenti Rodamina B base	87
	90
4. CONCLUSIONI (I PARTE)	
	92
5. RISULTATI E DISCUSSIONE (II PARTE)	
5.1 Sintesi del copolimero PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	92
5.2 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	98
5.3 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE contenenti Beclometasone dipropionato	102
5.4 Saggi biologici in vitro	109

6. CONCLUSIONI (II PARTE)	115
7. RISULTATI E DISCUSSIONE (III PARTE)	118
7.1 Sintesi dei copolimeri PHEA-PLA e PHEA-PEG ₂₀₀₀ -PLA	118
7.2 Preparazione e caratterizzazione di Nanoparticelle di PLA _(C) e PHEA-PEG ₂₀₀₀ -PLA _(B)	129
8. CONCLUSIONI (III PARTE)	142
9. PARTE SPERIMENTALE	144
9.1 Materiali e Metodi	144
9.2 Cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC)	145
9.3 Caratterizzazione tramite spettroscopia ¹ H-NMR ed FT-IR	146
9.4 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆	147
9.5 Sintesi e caratterizzazione del copolimero graft PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE.	150
9.6 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-PLA	152
9.7 Sintesi del copolimero PHEA-PEG ₂₀₀₀	154
9.8 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-PEG ₂₀₀₀ - PLA	155
9.9 Determinazione della concentrazione di aggregazione critica (CAC) dei copolimeri PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ , PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE mediante spettroscopia di fluorescenza	158
9.10 Preparazione di micelle a partire dai copolimeri PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ , PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	159
9.11 Preparazione di nanoparticelle a partire dai copolimeri PHEA-PLA e PHEA- PEG ₂₀₀₀ -PLA	160
9.12 Caratterizzazione delle micelle e nanoparticelle: dimensioni medie, PDI e potenziale zeta	161
9.13 Incorporazione di Acido Ferulico (AF) e Rodamina B base nelle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ e Beclometasone dipropionato (BDP) nelle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	162
9.14 Drug Loading (DL%)	164

9.15 Studi di rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ in PBS	167
9.16 Studi di rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ in plasma umano	168
9.17 Studi di rilascio di BDP dalle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE in PBS/Etanolo	169
9.18 Studi di stabilità delle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ , PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE alla conservazione	171
9.19 Studi di stabilità delle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ in un mezzo mimante le condizioni fisiologiche	171
9.20 Studi di solubilità del BDP all'interno delle micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	172
9.21 Test emolitici su micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ , PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	172
9.22 Studi di citotossicità in vitro su micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ , PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE	174
9.23 Studi di uptake di micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ e PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ contenenti Rodamina B base	177
9.24 Studi di uptake di micelle di PHEA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE contenenti BDP	178
9.25 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FE-SEM)	180
9.26 Analisi di Microscopia a Scansione Elettronica (SEM)	180
9.27 Analisi chimica di superficie	180
9.28 Analisi statistiche	181
10. BIBLIOGRAFIA	182

1. INTRODUZIONE

1.1 Le Nanotecnologie

Le Nanoscienze e le Nanotecnologie costituiscono un nuovo approccio scientifico che si basa sulla comprensione e la conoscenza approfondita delle proprietà della materia su scala nanometrica. Le nanoscienze operano in un ambito di investigazione multidisciplinare coinvolgendo molteplici indirizzi di ricerca, tra cui: biologia molecolare, chimica, scienza dei materiali, fisica, ingegneria meccanica ed elettronica e per tale motivo sono considerate scienze “orizzontali” [Moghimi *et al.*, 2005].

Il prefisso “nano” indica 10^{-9} , un nanometro (nm) equivale quindi ad un milionesimo di metro (**Figura 1.1**), una dimensione decine di migliaia di volte inferiore al diametro di un capello umano.

A questa scala le proprietà chimico-fisiche esibite dai materiali possono risultare sorprendentemente diverse da quelle possedute a scala più grande.

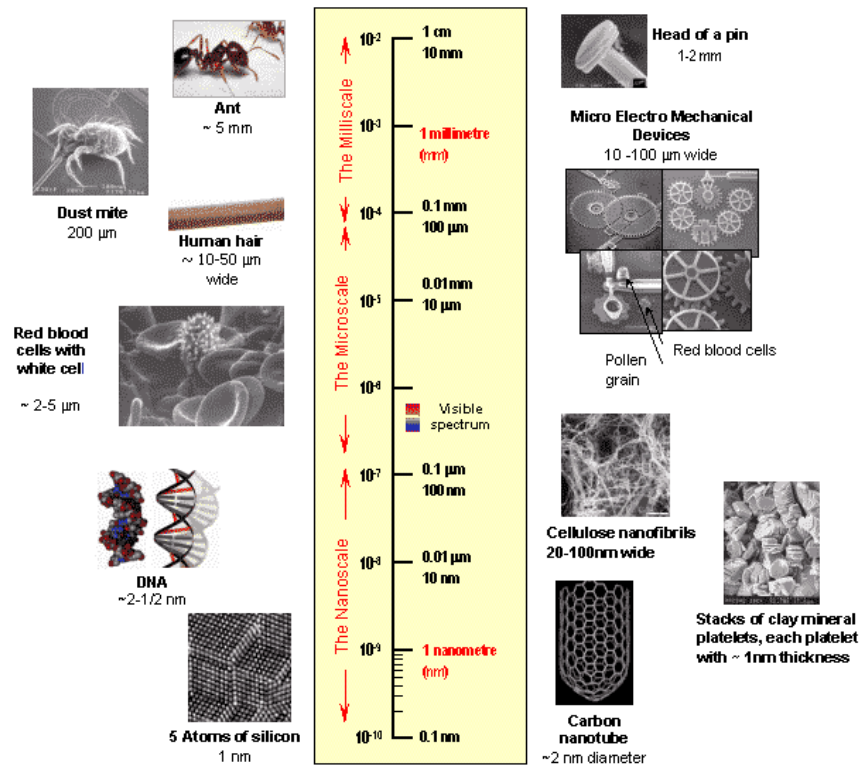


Figura 1.1: dal centimetro al nanometro

Il termine “nanotecnologia” nacque ufficialmente nel 1974, quando fu coniato dal professor Norio Taniguchi della Tokyo Science University per indicare la capacità di elaborare la materia a livello nanometrico. Due anni dopo, il termine fu ripreso da Eric Drexler, il quale definì la nanotecnologia come “una tecnologia a livello molecolare che ci potrà permettere di porre ogni atomo dove vogliamo che esso stia”.

In realtà, il primo a parlare delle possibilità offerte “dall’infinitamente piccolo” fu Richard Feynman, premio Nobel per la Fisica nel 1959, durante la famosa lezione tenuta il 29 dicembre 1959 al California Institute of Technology dal curioso titolo “*There’s plenty of room at the bottom*” (C’è un sacco di spazio giù in basso), nella quale disse:

“Considerate la possibilità che anche noi, come la biologia molecolare, siamo in grado di costruire oggetti piccolissimi, che facciano quello che vogliamo; allora potremo anche produrre macchine che manovrino a quel livello [...]. Non ho paura di dire che la questione decisiva sarà se alla fine – in un futuro lontano – saremo capaci di disporre gli atomi nel modo da noi voluto. Sì, giù giù, proprio sino agli atomi.”

Feynman illustrò, quindi, i benefici che sarebbero venuti alla società se si fosse stati in grado di manipolare la materia realizzando sistemi dell'ordine del nanometro [Feynman, 1960]. Negli anni a seguire in ambito scientifico cominciarono a moltiplicarsi gli studi sulle nanotecnologie, con un progressivo ampliamento del campo d'indagine, dalla medicina alla meccanica, dall'informatica all'ambiente.

Grazie all'apporto della Ricerca e Sviluppo, si stanno registrando progressi in un'ampia gamma di settori infatti, le nanotecnologie hanno creato una sorta di rivoluzione nelle scienze fisiche e nell'ingegneria, coniugando nuove possibili applicazioni e campi di studio.

Le nanotecnologie stanno progressivamente passando dai laboratori di ricerca al mercato ed il numero dei cosiddetti “*nanotechnology related products*” continua a crescere in maniera costante e con velocità crescente. Secondo un'indagine fatta dal Woodrow Wilson International Center for Scholars americano, dal marzo 2006 al

marzo 2007, il numero di tali prodotti censiti è passato da 212 a 475, vale a dire un incremento del 124% in un solo anno. I settori ai quali questi prodotti fanno riferimento sono i più disparati e vanno dai dispositivi elettronici ai cosmetici, dal tessile e abbigliamento, al biomedicale e all'alimentare, dall'automotive e aerospazio agli articoli sportivi. Insomma, anche se la piena realizzazione delle attese poste nelle nanotecnologie è collocata su un orizzonte ancora abbastanza lontano, la progressione è costante, sta accelerando e molti prodotti che incorporano le nanotecnologie sono ormai nelle mani dei consumatori. **(Figura 1.2).**

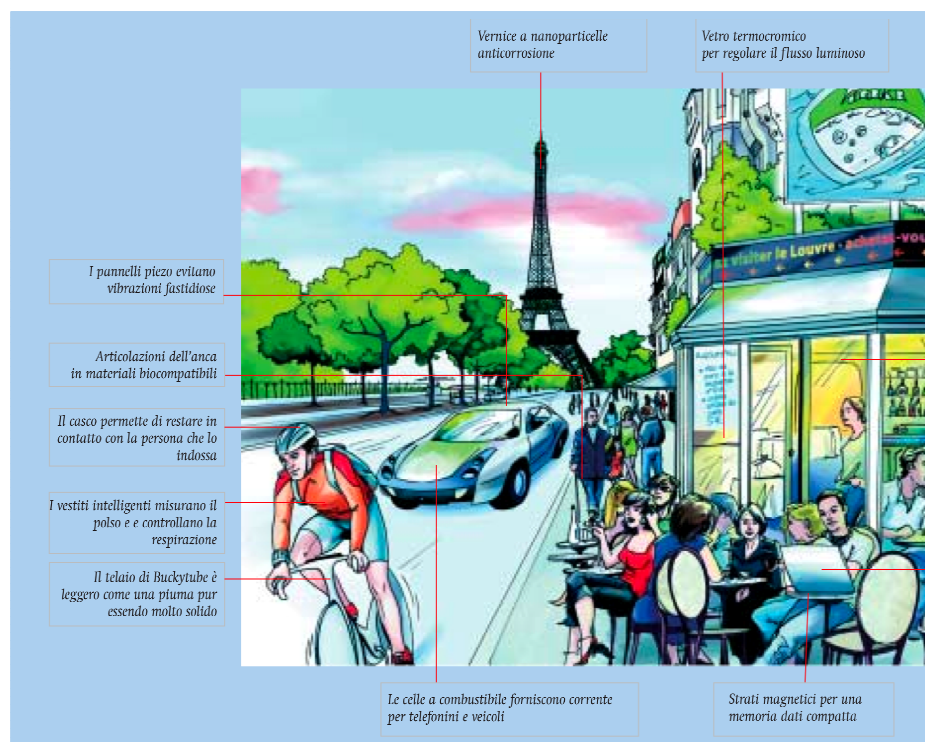


Figura 1.2: La nanotecnologia nella vita quotidiana del futuro

Considerata l'enorme importanza industriale, la vastità dei campi di applicazione e la continua crescita dei finanziamenti pubblici e privati per ricerche nell'ambito delle nanotecnologie è ormai parere universalmente riconosciuto da tantissimi analisti che

le nanotecnologie sono state considerate come la forza trainante per una nuova “rivoluzione industriale e tecnologica” o addirittura un nuovo Rinascimento della Scienza [Rocco *et al.*, 2001; Nordmann *et al.*, 2004; Zonneveld, 2008; Kjolberg *et al.*, 2008].

Per capire quanto concrete siano le aspettative, basti pensare che i finanziamenti pubblici e privati per la Ricerca & Sviluppo (R&S) delle nanoscienze e nanotecnologie negli ultimi anni sono aumentati esponenzialmente. L’investimento mondiale nell’R&S in campo nanotecnologica riportato dalle organizzazioni governative è aumentato di almeno 9 volte tra il 1997 e il 2005 (**Figura 1.3**), e almeno 60 paesi hanno iniziato ad investire in questo promettente settore dell’innovazione.

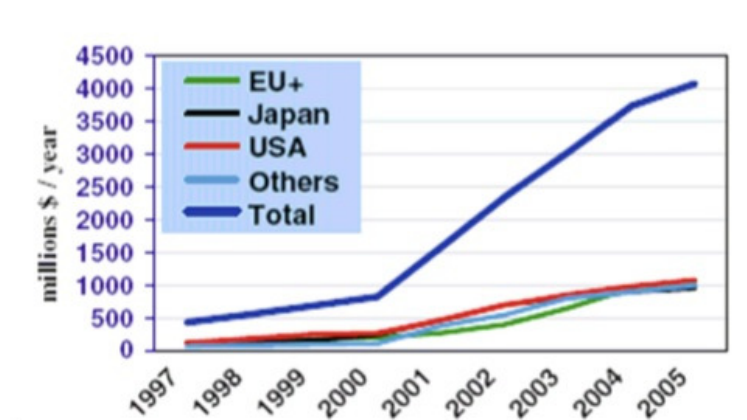


Figura 1.3: Investimenti in R&S nel settore delle Nanotecnologie (1997-2005) per Nazione.

Tutti i paesi industrialmente più evoluti, ma anche quelli in via di sviluppo, sono impegnati in un’intensa attività di R&S che è sempre maggiormente finanziata da

fondi pubblici, ancora considerati indispensabili per sostenere enormi sforzi dal punto di vista economico.

Tale ricerca è sostenuta prevalentemente a livello privato da “*companies*” molto presenti nel tessuto industrializzato degli USA e del Giappone, dove sono presenti le compagnie con maggiore fatturato (anche maggiore di 500 milioni di dollari) (**Figura 1.4**); seguono poi Germania ed UK con aziende dal fatturato medio-piccolo (10 milioni di dollari). Le aziende private non sono le uniche istituzioni attive nel campo delle nanotecnologie, molto presenti sono gli Istituti di Ricerca e gli Enti Universitari che giocano un ruolo fondamentale soprattutto in Europa ed Asia.

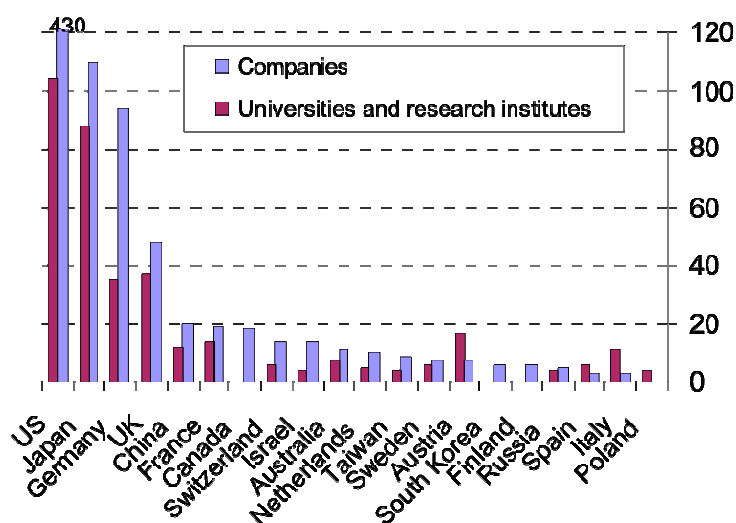


Figura 1.4: Numero di istituzioni impegnate nel campo delle Nanotecnologie per Nazione. Fonte: Cientifica, 2003.

Il crescente interesse per le nanotecnologie è inoltre confermato dal drastico aumento di citazioni dei termine “nanotechnology and drug delivery” nelle pubblicazioni scientifiche dal 1995 al 2009 (**Figura 1.5**).

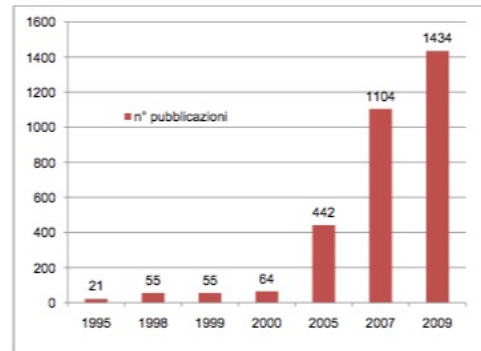


Figura 1.5: Evoluzione temporale del numero di pubblicazioni scientifiche per i termini nanotechnology and drug delivery.

Fonte: Pubmed

Fonte SCI database, 2006, Science Citation Index 1999-2004.

L'effettiva capacità di trasferire i risultati scientifici ottenuti nei laboratori di ricerca in applicazioni tecnologiche, può essere valutata prendendo in considerazione la variazione del numero di brevetti depositati per anno (**Figura 1.6**).

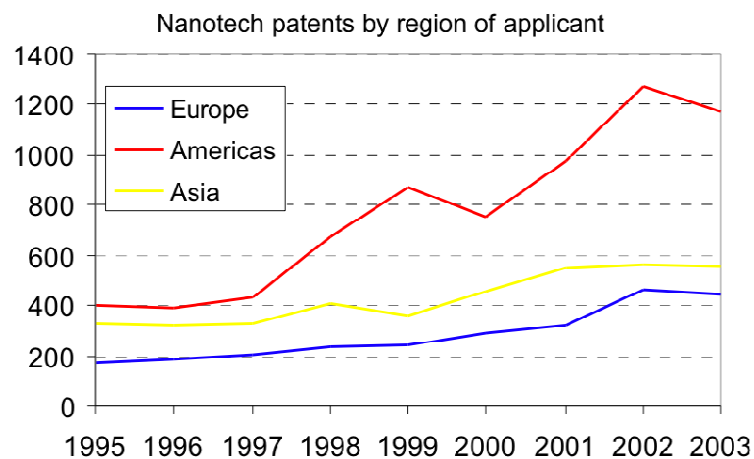
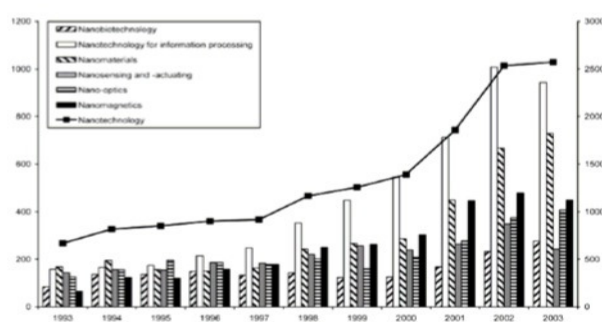


Figura 1.6: Numero di brevetti depositati nel mondo nel settore delle nanotecnologie.

Fonte EPO 2006.

Gli USA, ovviamente, costituiscono la regione maggiormente attiva nella registrazione di brevetti nanotecnologici con un distacco che negli ultimi anni è diventato piuttosto elevato.

Le applicazioni delle Nanotecnologie in medicina sono particolarmente promettenti e si sono già registrati significativi risultati nel campo della diagnostica precoce di numerose patologie, nel campo del rilascio modificato di farmaci, nell'area dell'*imaging* consentendo anche il monitoraggio del traffico cellulare. A testimonianza del forte impulso dell'industria biotecnologica e farmaceutica per le nanotecnologie, è interessante notare che dal 1997 al 2003 i brevetti depositati per anno nel settore Nanobioteecnologie e Nanobiomateriali sono in costante crescita (**Figura 1.7**) [Igami and Okazaki, 2007].

**Figura 1.7:** Numero di brevetti (1993-2003) per anno nel settore delle Nanotecnologie

L'analisi dei dati suggerisce, inoltre, che questi nei prossimi anni potranno considerarsi i principali settori di investimento all'interno del mondo delle Nanotecnologie [*Lux Research., 2006*].

1.2 Nanomedicina

L'applicazione in campo medico dei recenti progressi ottenuti nel settore delle nanotecnologie ha permesso lo sviluppo di una promettente area multidisciplinare definita come "nanomedicina". Beneficiando di approcci interdisciplinari convergenti, questa scienza mira a fornire un valido insieme di strumenti di ricerca e di dispositivi clinicamente utili nel campo della medicina rigenerativa, della diagnostica e dello sviluppo di nuovi approcci di drug delivery.

La Nanomedicina opera sulla stessa scala dei meccanismi biologici. Una molecola di DNA ha un diametro di circa 2.5 nm, mentre l'emoglobina di circa 5 nm. Le cellule umane hanno un diametro di 10-20 μm (da un minimo di 4 μm ad un massimo di 200 μm). Ciò significa che materiali e strumenti di dimensione nanometriche possono facilmente entrare nella maggior parte delle cellule.

Alcuni aspetti rimangono però irrisolti, soprattutto dal punto di vista della sicurezza [Brower, 2006], e della sorveglianza normativa [Ferrari, 2005]. Tuttavia, cresce il numero di prodotti trasferiti dal laboratorio di ricerca alla pratica clinica, si può quindi prevedere che le applicazioni basate sulle nanotecnologie giocheranno un ruolo sempre più importante nel miglioramento della sensibilità delle procedure diagnostiche e nell'aumento della specificità dei trattamenti di numerose patologie.

1.2.1 Nanostrutture nel Drug Delivery

La maggior parte degli strumenti utilizzati in nanomedicina come “carriers” di altre molecole sono chiamati nanovettori. L’uso di nanovettori quali trasportatori di farmaci è oggi l’epicentro delle moderne strategie di drug delivery.

Paul Ehrlich, farmacologo tedesco fondatore della chemioterapia e premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia, menzionò per primo questo concetto nel 19esimo secolo. Lui descrisse una “pallottola magica” (**Figura 1.8**) capace di trasportare i farmaci direttamente nella cellula tumorale bersaglio in modo da non agire sulle cellule circostanti.

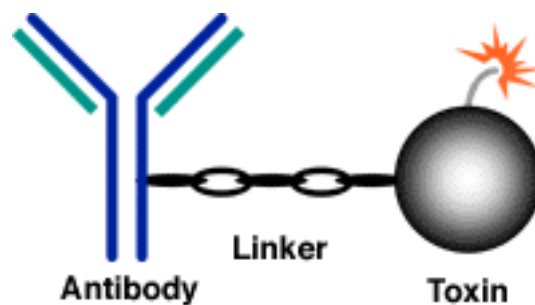


Figura 1.8: La “magic bullet” di Paul Ehrlich

Diverse tipologie di drug delivery systems (DDS) sono state sviluppate negli ultimi decenni e altrettante sono attualmente in corso di studio. [Prokop and Davidson, 2008]. Tra i diversi nanovettori proposti come delivery systems per la somministrazione di farmaci, particolare interesse hanno suscitato liposomi, dendrimeri, nanocristalli, nanoparticelle e micelle polimeriche, nanoshells, nanoparticelle d’oro [Muller, 1991; Lasic and Martin, 1995; Cohen and Bernstein, 1996; Torchilin and Trubetskoy, 1995; Torchilin, 1996].

Tali sistemi possono essere “resi intelligenti” mediante strategie di targeting che permettono di concentrare il farmaco solo dove necessario, potenziando la loro efficacia terapeutica e limitandone la presenza nel circolo sistemico, con conseguente riduzione degli effetti collaterali. Essi possono, inoltre, rispondere a determinati stimoli quali variazioni di pH o di temperatura, oppure essere realizzati in maniera tale da essere degradati lentamente nell’organismo (nel caso di polimeri biodegradabili) o eliminati tramite filtrazione renale [Duncan, 2003].

Micelle e nanoparticelle sono Nanovettori colloidali che contengono un principio attivo disperso, incapsulato, adsorbito oppure legato alla loro superficie [Rawat *et al.*, 2006]. Il loro utilizzo è applicabile in vari campi della nanomedicina, come l’imaging in ambito diagnostico ed il trasporto di farmaci, acidi nucleici e proteine [Chorny *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006; Mitra *et al.*, 2006]. In particolare, questi Nanovettori sono molto utili nel drug delivery, poichè permettono il trasporto per via sistemica di farmaci anche insolubili in acqua [Zeng *et al.*, 2004; Torchilin, 2005].

1.2.2 Sistemi direzionati

Obiettivo dei “targeted drug delivery systems” è quello di veicolare un farmaco in modo selettivo verso un organo o un tessuto bersaglio, in modo tale da incrementarne l’accumulo in aree patologiche ben definite, sfruttando le differenze biochimiche e metaboliche fra cellule “malate” e cellule “sane” e di rilasciarlo in maniera prolungata nel tempo.

1.2.3 Targeting Passivo

Numerosi fenomeni patologici, responsabili di provocare nell'organismo alterazioni di tipo infettivo, infiammatorio o ischemico, producono nelle aree colpite anche un'aumentata permeabilità dei vasi sanguigni che le irrorano, facendo sì che si verifichi in tali sedi un accumulo preferenziale di nanocarrier [Palmer *et al.*, 1984; Maeda *et al.*, 2000]. Nei tumori solidi inoltre, insieme alla maggiore permeabilità dei vasi, si riscontra un danneggiamento delle vie linfatiche, che permette un ulteriore accumulo delle molecole trasportate negli interstizi cellulari causato da uno scarso drenaggio linfatico, fenomeno che provoca un aumento della ritenzione della zona interessata (effetto EPR, *Enhanced Permeability and Retention*) (**Figura 1.9**).

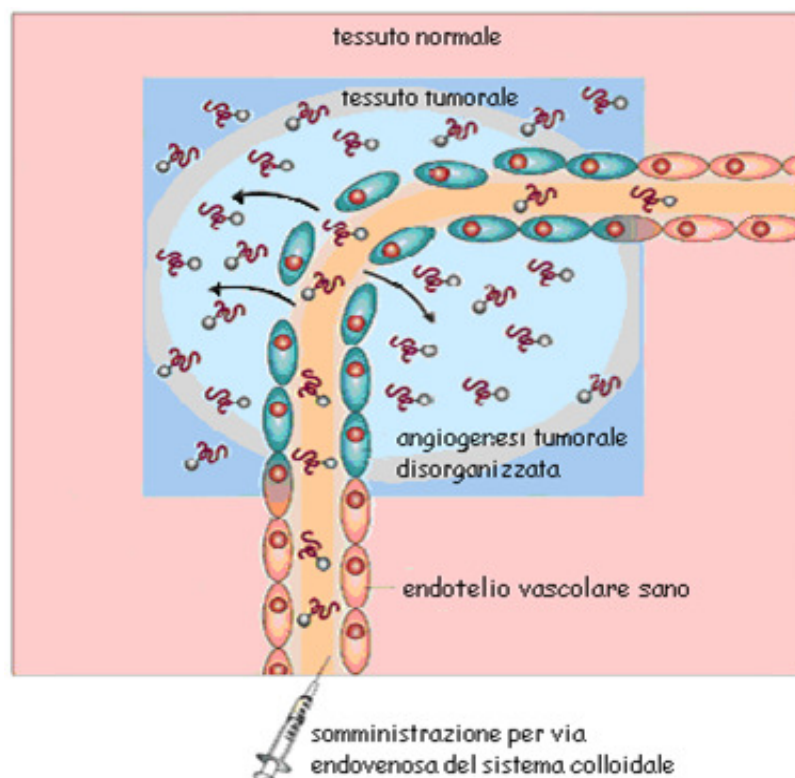


Figura 1.9: Rappresentazione schematica dell'effetto EPR

Affinchè si assista però alla diffusione e all'accumulo di carrier nei tessuti neoplastici, è necessario che le dimensioni di questi sistemi colloidali siano paragonabili ai diametri delle fenestrate dei capillari che irrorano le masse tumorali, diametri che variano in base al tipo stesso di tumore [*Yuan et al., 1995; Monsky et al., 1999*]

I sistemi micellari, rispetto a quelli nanoparticellari, grazie alle dimensioni ridotte (comprese tra 10 e 50 nm) espletano bene la funzione di vettori di principi attivi poiché le loro dimensioni risultano essere inferiori alle più piccole fenestrate riscontrate in sede tumorale.

1.2.4 Targeting Attivo

La realizzazione di sistemi nanostrutturati polimerici può prevedere la coniugazione sulla loro superficie di molecole direzionanti [*Gao et al., 2005*]. Tra i possibili ligandi vanno ricordati anticorpi [*Liaw et al., 2001; Torchilin, 2004*], porzioni zuccherine, transferrina [*Torchilin, 2004; Jule et al., 2003; Ogris et al., 1999*] e residui di folato [*Dash et al., 2000*]. Gli ultimi due sono attualmente adoperati nel direzionamento di principi attivi a cellule tumorali, poiché la maggior parte di esse presenta una sovraespressione sulla loro superficie di recettori specifici per il folato e per la transferrina. È stato dimostrato che micelle di dimensioni

comprese tra 70 e 100 nm, formate dai copolimeri anfifilici di PEG e polietileneimina se opportunamente coniugate con transferrina sono capaci di direzionare attivamente farmaci a tumori che sovraesprimono il suo recettore [Torchilin, 2004]. Analoghi risultati si sono ottenuti preparando micelle che espongono sulla loro superficie residui di folato [Park et al., 2005; Leamon and Low, 2001]. È risaputo infatti che i carcinomi ovarici, nasofaringei, cervicali e del colon esprimono in maniera non fisiologica alti livelli di recettori per il folato (FR- α) [Wu et al., 1999].

1.2.5 Strategie per il superamento delle barriere cellulari

Un nuovo approccio per il rilascio intracellulare di diverse molecole prevede la modificazione di nanoparticelle con peptidi e proteine che hanno la capacità di penetrare nelle cellule (CPPs *cell-penetrating peptides and proteins*) semplicemente traslocando attraverso la membrana cellulare, senza coinvolgere meccanismi di endocitosi [Torchilin, 2006; Breunig et al., 2008]. Generalmente sono peptidi costituiti da un numero di residui amminoacidi inferiori a 30 ed hanno una carica netta positiva. In questi anni, sono state individuate diverse sequenze proteiche che con queste capacità tra cui una delle più studiate è la proteina derivante dal virus HIV-1 di 86 residui amminoacidici chiamata TAT (*trans-activating transcriptional activator*), che è stata dimostrata essere efficientemente captata da diversi tipi di cellula quando aggiunta al mezzo circostante [Green et al., 1988; Frankel et al., 1988]. I CPP possono essere divisi in due categorie: la prima consiste di peptidi elicoidali

anfipatici, dove la lisina è l'amminoacido che contribuisce maggiormente alla carica positiva; la seconda classe include i peptidi ricchi in arginine come il TAT [*Torchilin, 2006*]. La loro capacità di traslocare attraverso la membrana plasmatica è confinata ad una corta sequenza meno di 20 amminoacidi, che sono molto ricchi in residui basici [*Schwarze et al., 2000*].

E' stato riportato che liposomi Peghilati e di dimensioni non relativamente grandi (200 nm) possono essere captati da diverse cellule grazie alla funzionalizzazione con diverse molecole di TAT peptide (TATp) legati alla loro superficie tramite uno *spacer* di EG-fosfatidiletanolamina [*Kale and Torchilin, 2007*].

1.2.6 Proprietà Stealth dei sistemi nanostrutturati

Pertanto, quando si sviluppano sistemi iniettabili per via parenterale è obbligatorio verificare l'effettiva biocompatibilità del sistema, poichè da essi dipende l'insorgenza di effetti emi e citotossici, così come l'emivita delle Nanoparticelle nel sistema circolatorio, determinante affinché il farmaco possa giungere nel sito target senza disperdersi.

In seguito all'iniezione endovenosa le Nanoparticelle vengono rapidamente rimosse dalla circolazione dal RES e di conseguenza mostrano un'emivita relativamente breve [*Leroux et al., 1995*]. Questo processo avviene poichè le Nanoparticelle presenti nel sangue adsorbono sulla loro superficie in modo aspecifico alcune proteine sieriche, chiamate "opsonine", che le rendono facilmente riconoscibili dai

macrofagi del RES. Le più comuni opsonine sono le proteine del complemento, come le immunoglobuline C3, C4 e C5 [Owens *et al.*, 2006]. In seguito all'adsorbimento di opsonine i Nanosistemi possono attivare la via classica o alternativa del complemento [Marjan *et al.*, 1994]. Il processo di opsonizzazione comporta inoltre la rapida aggregazione delle Nanoparticelle e la fagocitosi da parte dei macrofagi circolanti, con conseguente eliminazione dalla circolazione sanguigna ed accumulo a livello epatico, dove possono causare effetti indesiderati [Lenaerts *et al.*, 1984].

La carica di superficie ha un ruolo fondamentale nel processo di opsonizzazione: nanosistemi neutri vengono opsonizzati molto più lentamente di particelle cariche [Roser *et al.*, 1998]. E' stato dimostrato che la "Peghilazione" riduce l'adsorbimento di proteine sieriche, prolungando l'emivita delle Nanoparticelle nel siero [Bazile *et al.*, 1995] in quanto il PEG impedisce stericamente le interazioni delle nanoparticelle con le suddette proteine [Senior *et al.*, 1991; Woodle, 1993; Allen, 1994; Chonn *et al.*, 1991; Chonn *et al.*, 1992; Lasic *et al.*, 1991].

La spiegazione della capacità del PEG di ostacolare l'adesione delle opsonine è da attribuirsi alla sua catena idrofila e flessibile che quando presente in soluzione acquista una conformazione molto estesa. Le opsonine quando vengono attratte dalla superficie delle particelle incontrano le catene di PEG distese in superficie ed iniziano a comprimerle; questa compressione forza le catene di PEG in una conformazione ad alta energia. La variazione conformazionale crea dunque delle forze repulsive abbastanza grandi da bilanciare completamente o superare le forze attrattive fra le opsonine e la superficie delle particelle.

Tuttavia, per ottenere un'effettiva repulsione delle opsonine, è necessario che lo strato superficiale abbia uno spessore opportuno, il cui valore dipende dal peso molecolare, dalla densità delle catene superficiali e dalla conformazione del PEG [Klibanov *et al.*, 1990; Owens III and Peppas, 2006]. Numerose ricerche indicano che il peso molecolare delle catene di PEG deve essere pari o superiore ai 2000 Da per ottenere dei sistemi con caratteristiche *stealth* e, aumentando il peso molecolare sopra il valore di 2000 Da, aumenta la flessibilità delle catene di PEG ed anche l'emivita delle particelle. [Gref *et al.*, 1994; Leroux *et al.*, 1995; Peracchia, 2003]. Come polimero di protezione il PEG fornisce una combinazione molto interessante di proprietà: solubilità eccellente in soluzioni acquose, elevata flessibilità delle catene polimeriche, tossicità molto bassa, assenza di immunogenicità, antigenicità ed accumulo nelle cellule del RES, minima influenza sulle proprietà biologiche dei farmaci [Zalipsky, 1995; Pang, 1993; Powell, 1980; Yamaoka *et al.*, 1994].

Oltre all'attivazione del complemento dovuta al processo di opsonizzazione, l'interazione delle Nanoparticelle con il sangue può causare altre complicazioni. E' stato dimostrato che Nanoparticelle cationiche, causano emolisi ed alterazione della velocità di coagulazione, a differenza di Nanoparticelle anioniche che risultano essere abbastanza atossiche [Borm *et al.*, 2006].

1.2.7 Tossicità dei sistemi Nanostrutturati

In generale, qualunque sia l'applicazione della nanomedicina, compreso l'uso di Nanoparticelle o Micelle per il drug delivery, bisogna considerare la possibile insorgenza di effetti collaterali. Ciò è dovuto al fatto che un dispositivo nanostrutturato possiede proprietà chimico-fisiche diverse da quelle di particelle di dimensioni maggiori, che possono determinare cambiamenti nella distribuzione sistemica, attivare i processi di coagulazione ed influire sul metabolismo cellulare. Le caratteristiche di superficie rappresentano un fattore determinante poiché questa rappresenta l'interfaccia d'interazione con i componenti biologici. La dimensione ridotta, unita all'elevata energia di superficie, rende i Nanosistemi molto reattivi rispetto a particelle più grandi, in quanto il rapporto superficie/volume risulta parecchio elevato, e questo può comportare un aumento della loro tossicità. Ad esempio, particelle di piccole dimensioni con superfici idrofobiche vengono eliminate dalle cellule fagocitiche e di conseguenza si accumulano facilmente nel fegato e nella milza [Borm *et al.*, 2006; Gref *et al.*, 1994]. I nanosistemi possono attivare i processi infiammatori [Brown *et al.*, 2004], o indurre la generazione di specie reattive dell'ossigeno, che comportano uno stress ossidativo inibente la funzionalità degli epatociti [Brown *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 1994].

In ogni caso, recentemente, si sta sviluppando parallelamente all'applicazione delle nanotecnologie in medicina, una disciplina quale la nanotossicologia con lo sviluppo e messa a punto di protocolli e procedure per la valutazione della tossicità dei materiali nanostrutturati.

1.3 Micelle Polimeriche

1.3.1 Generalità

Le micelle polimeriche come carrier di farmaci sono state introdotte da Ringsdorf nel 1984 [*Bader et al., 1984*]; esse si ottengono dall'autoaggregazione in mezzo acquoso di polimeri anfifilici, contenenti cioè sia porzioni idrofile che idrofobe con opposta affinità nei confronti del solvente [*Mittal and Lindman, 1991*].

L'impiego di tali sistemi ha catalizzato grande interesse grazie alle peculiari caratteristiche dei polimeri adoperati, quali biocompatibilità, biodegradabilità e molteplicità di gruppo funzionale potenzialmente utilizzabili per la coniugazione con molecole direzionanti [*Andrianov and Payne, 1998*].

La capacità mostrata dalle micelle polimeriche di aumentare la solubilità di farmaci idrofobi è dovuta alla loro composizione strutturale. In acqua, i frammenti idrofobici di molecole anfifiliche formano il “*core*” della micella, che funge da spazio funzionale per accogliere il farmaco idrofobo. Sulla superficie esterna, a contatto con il mezzo acquoso, si dispone invece la “*shell*”, costituita dalle porzioni idrofile del polimero [*Zhang and Eisenberg, 1995*].

Le micelle mostrano un'alta stabilità termodinamica poichè la forza che spinge i copolimeri anfifilici ad autoassemblarsi è la diminuzione dell'energia libera e il contemporaneo aumento entropico dovuti alla rimozione delle porzioni idrofobe dall'ambiente acquoso, all'esposizione della porzione idrofila verso l'acqua [*Kwon and Okano 1999; Martin, 1993*]. Tale fenomeno è favorito anche dal ripristino dei

legami idrogeno tra le molecole d'acqua e dall'instaurarsi di forze di Wan der Waals tra i gruppi idrofobici all'interno del sistema, le quali permettono di ottenere un ulteriore guadagno energetico [*Jones and Leroux, 1999*]

Analogamente ai tensioattivi a basso peso molecolare, le micelle polimeriche sono caratterizzate, ad una data temperatura, da un valore di concentrazione, definita concentrazione di aggregazione critica (CAC), al di sopra della quale avviene l'aggregazione in un dato mezzo (generalmente acqua). La CAC è normalmente un valore abbastanza basso, dell'ordine di $10^{-6} - 10^{-7}$ M, contrariamente a quanto si verifica per le micelle costituite da tensioattivi a basso peso molecolare la cui concentrazione critica di aggregazione è in genere dell'ordine di $10^{-3} - 10^{-4}$ M.

A valori di concentrazione pari alla CAC o poco superiori le micelle risultano però ancora poco compatte a causa della grande quantità di acqua presente nel “core” micellare. Con l'aumento della concentrazione di copolimero anfifilico in soluzione l'equilibrio va via via spostandosi verso la formazione delle micelle che, perdendo il residuo di solvente acquoso presente nel “core”, diventano più stabili e più compatte. Com'è facile intuire, quindi, il basso valore di CAC conferisce alle micelle polimeriche stabilità alla diluizione; ciò è particolarmente importante dal punto di vista fisiologico e farmacologico considerando che in seguito a somministrazione endovenosa, il grande volume di sangue pari a 5 - 6 litri esercita una forte diluizione, che per sistemi micellari con basso valore di CAC non ne determina la dissociazione in unimeri causando un prematuro rilascio del farmaco incorporato. [*Kabanov et al.,*

1989; La et al., 1996; Kwon and Kataoka, 1995; Muranishi et al., 1981; Gao and Eisenberg, 1993; Marques, 1997].

1.3.2 Metodi di preparazione delle micelle polimeriche

Le micelle polimeriche possono essere preparate con diverse metodologie, tra cui dissoluzione diretta o per dialisi (**Figura 1.10**) [Allen et al., 1999].

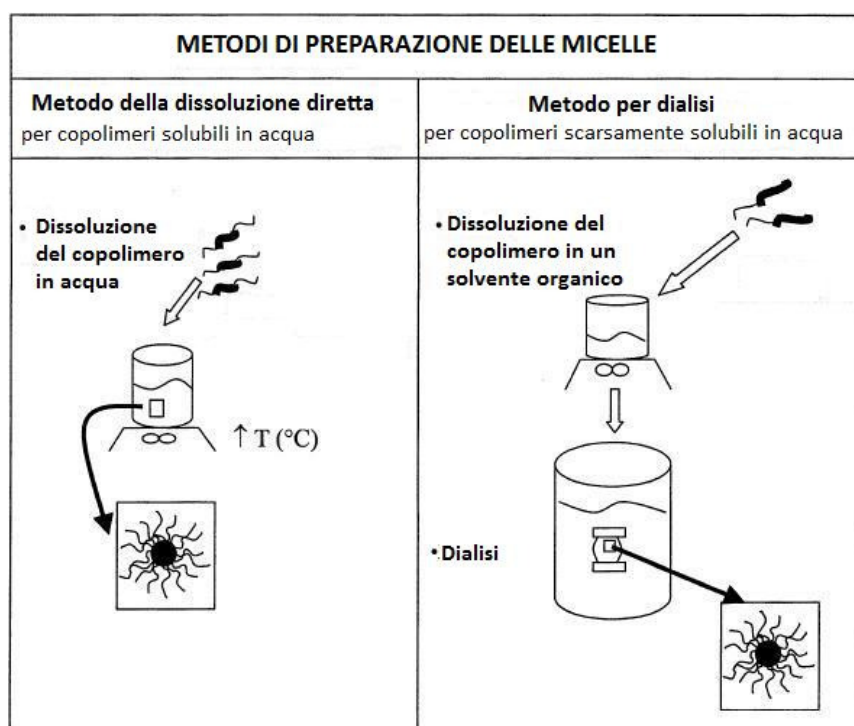


Figura 1.10: Schema dei due principali metodi per la preparazione di micelle polimeriche.

Il primo metodo, adottato per copolimeri solubili in acqua consiste nella dispersione del copolimero in un mezzo acquoso a temperatura ambiente o maggiore e ad una concentrazione ben al di sopra della CAC. In alcuni casi il farmaco viene miscelato con il polimero prima della sua dissoluzione in acqua, ottenendo una preliminare

interazione tra polimero e farmaco [Cavallaro *et al.*, 2003; Cavallaro *et al.*, 2004]. I copolimeri con una bassa solubilità in acqua sono invece usati per formare micelle attraverso il metodo della dialisi, che prevede la dissoluzione del copolimero in un solvente organico miscibile con acqua, come ad esempio il dimetilsolfossido (DMSO), dimetilformammide (DMF), tetraidrofurano (THF), ecetonitrile e successiva dialisi contro acqua [Harada and Kataoka, 1998; Kwon *et al.*, 1997].

1.3.3 Incorporazione di farmaci all'interno di micelle polimeriche

Il processo di incorporazione di farmaci poco solubili all'interno di micelle polimeriche, dipende dal tipo e dall'efficacia delle interazioni tra il farmaco e le catene idrofobiche formanti il “*core*”, dalle interazioni tra il farmaco solubilizzato e i blocchi idrofilici che costituiscono la “*shell*”, così come dalle interazioni interfacciali tra il farmaco e il solvente acquoso.

Durante il processo di incorporazione il principio attivo si sostituisce alle molecole di solvente all'interno del “*core*”, spingendo via le catene idrofobiche da quest'area. Un'estesa solubilizzazione può quindi determinare un aumento della dimensione della micella in seguito all'espansione del “*core*” contenente il farmaco solubilizzato all'interno [Xing and Mattice, 1998]

L'efficacia dell'incorporazione del farmaco può essere influenzata anche dalla dimensione delle catene formanti il “*core*” e dalla dimensione delle catene che danno origine alla “*shell*” esterna [Allen *et al.*, 1999]. Più grande è la catena idrofobica

maggiore sarà la dimensione del “*core*” e quindi maggiore la capacità di trattenere il farmaco idrofobico.

Anche il bilancio delle porzioni idrofobiche/idrofile della molecola di farmaco stesso andrà ad influenzare la capacità di caricamento, nonché la localizzazione della molecola di farmaco nei diversi compartimenti della micella. Le molecole di farmaco che si localizzano all’interno della “*shell*” o in prossimità di essa possono essere rilasciate dalla micella piuttosto velocemente e in genere queste molecole sono ritenute responsabili della componente del “burst-effect” della risultante curva di rilascio [Teng *et al.*, 1998; Benoit *et al.*, 1986; Donbrow, 1992].

L’eccessiva stabilizzazione dell’interazione farmaco/micella polimerica può influenzare negativamente la biodisponibilità e l’efficacia del farmaco, poichè il farmaco potrebbe non essere rilasciato da tali micelle [Yu *et al.*, 1996]. Per queste ragioni è necessario trovare il giusto bilancio tra stabilità della micella e capacità che questa possiede di dissociarsi o degradarsi.

La velocità di rilascio del farmaco dalla micella può essere controllata da un insieme di parametri come la struttura della micella, la dimensione della porzione idrofobica, lo stato del “*core*” micellare, il valore di pH del mezzo esterno e la temperatura [La *et al.*, 1996].

1.3.4 Caratteristiche delle micelle polimeriche

Lo studio morfologico e funzionale delle micelle polimeriche viene effettuato attraverso misure di light-scattering, tecnica che consente di determinare dimensioni medie e geometria delle micelle stesse (es. di tipo sferico, ellissoidale, vescicolare o tubulare-ramificata, lamellare e molte altre) [Cameron *et al.*, 1999]. La morfologia delle micelle polimeriche viene determinata dalla conformazione dei polimeri che le costituiscono, dalla loro concentrazione e dal tipo di solvente utilizzato per la preparazione dei sistemi. [Zhang and Eisenberg, 1995; Allen *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997]. In genere strutture non sferiche sono spesso formate da copolimeri a blocchi asimmetrici in cui la porzione idrofila è più grande di quella lipofila [Zhang *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997].

La stabilità delle micelle sia *in vitro* che *in vivo*, così come l'eliminazione dall'organismo, dipende dal loro valore di CAC. È comunque importante distinguere tra stabilità termodinamica e stabilità cinetica. La stabilità termodinamica è correlata alla CAC, al di sotto della quale l'equilibrio è spostato verso la formazione degli unimeri. La stabilità cinetica fornisce invece informazioni sul tempo reale della dissociazione delle micelle in unimeri, dato che, anche in seguito a diluizioni a concentrazioni inferiori alla CAC, le micelle preformate possono esistere persino per lungo tempo e svolgere la propria funzione di vettore. La stabilità cinetica, o meglio la velocità reale della dissociazione delle micelle ad una concentrazione inferiore alla CAC, dipende da molti fattori che includono lo stato fisico del “core” micellare, il contenuto di solvente all'interno del *core*, la dimensione dei blocchi idrofobici e il

rapporto tra porzioni idrofobiche e porzioni idrofile [Tian *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995; Creutz *et al.*, 1998].

1.3.5 Composizione delle micelle polimeriche

Numerose tipologie di polimeri sono state utilizzate per la costituzione di macromolecole anfifiliche in grado di formare per autoassemblamento strutture micellari.

Per la porzione idrofila sono frequentemente utilizzati i poli(etilenglicoli) (PEG) con un peso molecolare compreso tra 1 e 15 kDa [Kwon, 1998]. Il largo uso di questo polimero è da ricondurre al basso costo, alla limitata tossicità e al suo elevato grado di idratazione che stabilizza i sistemi nano strutturati in ambiente acquoso [Calvo *et al.*, 2001; Moghimi, 2002]. Il PEG, come discusso in precedenza, è capace di ridurre il riconoscimento immunitario dei sistemi colloidali in genere ad opera dei macrofagi del Sistema Reticolo-Endoteliale. E' stato inoltre approvato dalla Food and Drugs Administration per le somministrazioni parenterali [Veronese and Harris, 2002].

Altre valide alternative al PEG, sono il poli(N-vinil-2-pirrolidone) (PVP), dotato di un'alta bicompatibilità [Johnson *et al.*, 1992] ed usato in formulazioni come liposomi [Torchilin *et al.*, 1994], nano particelle [Sharma *et al.*, 1996], microsfele [Moneghini *et al.*, 2000] e micelle polimeriche [Banahmed *et al.*, 2001]; il poli(vinil alcol) (PVA) usato per formare un suo copolimero poli(vinilalcol-co-viniloleato), utile a preparare micelle che incrementano la permeazione transcutanea del retinil palmitato [Luppi *et*

al., 2002]; la poli(etilenimmina) (PEI) utilizzata in copolimeri a blocchi PEI-PLGA [Nam *et al.*, 2003].

Diversi polimeri possono essere usati per formare il *core* idrofobico. La lista include polimeri di propilen ossido [Kabanov *et al.*, 1989; Miller, 1997], L-lisina [Katayose and Kataoka, 1998; Trubetskoy *et al.*, 1997], acido aspartico [Yokoyama *et al.*, 1990; Harada and Kataoka, 1998], β -benzoil-L-aspartato [La *et al.*, 1996; Kwon *et al.*, 1997], γ -benzil-L-glutammato [Jeong *et al.*, 1998], caprolattone [Kim *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1998], D,L- acido lattico [Ramaswamy *et al.*, 1997; Hagan *et al.*, 1996], spermina [Kabanov, 1998]. In alcuni casi possono essere usati per la formazione del *core* idrofobico residui fosfolipidici corti, ma estremamente idrofobici data la presenza di due catene di gruppi acilici grassi [Trubetskoy and Torchilin, 1995], o catene idrocarburiche con 12-18 atomi di carbonio [Lavasanifar *et al.*, 2001; Cavallaro *et al.*, 2003; Cavallaro *et al.*, 2004]. In alcuni casi il polimero di partenza può essere preparato usando due blocchi idrofobici ed uno di questi blocchi è ottenuto per legame del polimero con un farmaco idrofobico (come taxolo, cisplatino, antracicline, unità idrofobiche per uso diagnostico, etc.) producendo polimeri anfifilici formanti le micelle [Kwon and Kataoka, 1995; Trubetskoy *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1996].

1.4 Nanoparticelle Polimeriche

1.4.1 Generalità

Nell'ambito dei sistemi particolati per nanoparticelle si intendono carrier con diametro compreso tra 10 -1000 nm.

Tali sistemi nanoparticolati sono costituiti da polimeri sintetici o naturali che possono essere modificati al fine di modulare la cinetica di rilascio del farmaco. Il meccanismo del rilascio dalla matrice polimerica costituente le particelle dipende in larga parte dalle caratteristiche del polimero: nel caso di polimeri non biodegradabili, il rilascio è infatti funzione della velocità di diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica; per polimeri biodegradabili, invece, contribuiscono in maniera determinante (1) la degradazione della matrice con conseguente liberazione del farmaco in essa intrappolato e (2) la solubilizzazione e la diffusione del farmaco attraverso i canali che si formano nella matrice, come conseguenza della sua erosione [Panyam *et al.*, 2003]. In entrambi i casi si assiste comunque ad un iniziale rapido rilascio della aliquota di farmaco presente in superficie (*burst effect*). La cinetica di rilascio del farmaco dipende quindi da diverse variabili, che includono le caratteristiche chimico-fisiche del farmaco (dimensioni e solubilità), le proprietà del polimero (biodegradabilità, composizione e peso molecolare) e il metodo di produzione delle particelle.

1.4.2. Metodiche di preparazione delle nanoparticelle polimeriche

Sono state sviluppate numerose metodiche allo scopo di preparare nanoparticelle polimeriche. Il metodo selezionato varierà le caratteristiche finali delle particelle, tra

cui la dimensione, che rappresenta la proprietà più importante per la scelta finale della via di somministrazione [Lassalle and Ferreira, 2007]. Un'altra caratteristica che è fortemente influenzata dal processo di preparazione è la capacità di interazione con il principio attivo contenuto nella formulazione.

Per tali motivi è di cruciale importanza conoscere i parametri sperimentali coinvolti in ciascun metodo, quali solventi utilizzati, temperatura, eventuali stabilizzanti usati, e la velocità di agitazione, così come gli effetti prodotti dalla modificazione di ognuno di questi sulle caratteristiche finali delle particelle ottenute, come dimensioni, struttura, morfologia e performance di tali sistemi come *Controlled Drug Delivery Systems*.

Nanoprecipitazione

Il metodo delle nanoprecipitazione è stato descritto per la prima volta da Fessi e collaboratori [Fessi et al., 1989]. Esso si basa sulla precipitazione interfacciale di polimero a seguito dell'allontanamento del solvente immiscibile con acqua dalla fase organica, in cui il polimero stesso è disciolto. Si realizza mediante un sistema a tre componenti: il polimero, il solvente in cui il polimero è solubile ed un non-solvente (talvolta acqua). Il solvente organico deve essere miscibile con l'acqua e facile da eliminare per evaporazione o per dialisi; per tale motivo, l'acetone o l'acetonitrile sono quelli utilizzati più frequentemente [Legrand et al., 2007].

La soluzione polimerica viene lentamente aggiunta al non-solvente; la formazione delle particelle avviene quindi in seguito alla rapida diffusione del solvente organico nella fase acquosa, con conseguente precipitazione del polimero.

Il metodo appena citato può essere applicato ad una varietà di polimeri [*Ganachaud e Katz, 2007*], inclusi peptidi [*Duclairoir et al., 1998*], ma anche materiali non polimerici come ciclodestrine anfifiliche [*Skiba et al, 1996*] e farmaci [*Lannibois-Drean, 1995; Lannibois et al., 1997*].

È abbastanza chiaro che esiste una stretta relazione tra le variabili sperimentali coinvolte nel metodo della nanoprecipitazione e le dimensioni delle particelle risultanti. Ad esempio un ruolo molto importante svolge il non-solvente per il polimero nel determinare dimensione e forma delle nanoparticelle [*Peltonen et al., 2002*]. Inoltre, numerosi studi dimostrano che anche la concentrazione di polimero impiegata è molto importante nel determinare la dimensione delle particelle, così come la quantità di non-solvente per il polimero incorporata nella fase organica [*Chorny et al., 2002*].

Spray drying

In tale metodica, le nanosfere si possono ottenere dissolvendo o disperdendo il farmaco ed il polimero in un opportuno solvente organico e successivamente nebulizzando la soluzione organica sotto un flusso di aria calda. Il solvente evaporerà istantaneamente permettendo la formazione delle nanoparticelle, che possono essere

raccolte. Tale procedura è rapida e si presta bene allo *scaling up* industriale, sebbene presenti uno svantaggio rappresentato dalla non uniformità delle dimensioni particellari medie, che rappresenta una limitazione riguardo alla possibile via di somministrazione [Felder, et al., 2003]. Inoltre tale tecnica è sempre associata a basse rese dovute a perdita di materiale durante il processo, causata dall'adesione delle particelle alle pareti dell'apparecchio e/o una possibile aggregazione delle particelle stesse.

Salting out

Questa procedura prevede l'uso di una soluzione di polimero e farmaco in un solvente miscibile in acqua come l'acetone, o il tetraidrofurano (THF).

La soluzione viene emulsionata sotto vigorosa agitazione in una soluzione acquosa contenente alte concentrazioni dell'agente determinante il *salting out*, e se richiesto, uno stabilizzante (spesso tensioattivo) [Ibrahim et al., 1992]. L'addizione successiva di un largo eccesso di acqua all'emulsione O/W, inducendo l'annullamento dell'effetto di salting out e la diffusione del solvente organico nella fase acquosa esterna, porta alla formazione di nanosfere, che sono successivamente purificate e raccolte attraverso filtrazione.

I composti utilizzati in tale procedura come agenti per il salting out sono elettroliti come cloruro di magnesio, cloruro di sodio o acetato di magnesio, oppure non elettroliti come il saccarosio.

Questo metodo rappresenta quello di elezione ancorchè devono essere utilizzate elevate quantità di farmaco e polimero. Alcune importanti limitazioni legate a questa tecnica riguardano la necessità di una purificazione esaustiva e la frequente incompatibilità dei sali impiegati con i composti bioattivi [Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998].

Metodi basati sull'emulsione: evaporazione o estrazione del solvente

I metodi che si basano sull'emulsione prevedono l'eliminazione del solvente organico usato per solubilizzare il polimero nella fase finale del processo. Questa eliminazione può essere eseguita attraverso evaporazione o mediante estrazione. Prerequisito necessario è la formazione di un'emulsione *oil-in water* (O/W), costituita da una fase acquosa ed una organica.

Il polimero, che è insolubile in acqua, si trova disciolto nella fase organica mentre il tensioattivo, necessario per la formazione dell'emulsione, in quella acquosa. Le gocce di fase organica, contenenti il polimero ed il principio attivo, daranno vita a micro- e nanosfere dopo eliminazione del solvente organico [Freitas and Marchetti, 2005]. Sebbene tale metodo basato sulla formazione di un'emulsione e successiva estrazione o evaporazione del solvente organico sia molto semplice, le variabili da tenere in considerazione allo scopo di ottimizzare le proprietà dei sistemi ottenuti sono risultate essere numerose.

Per ciò che concerne il *solvente* in cui è disciolto il polimero, questo deve essere immiscibile con la fase acquosa. Inoltre il suo punto di ebollizione deve essere più basso di quello del solvente con cui è emulsionato, allo scopo di assicurarne una completa eliminazione per evaporazione. I solventi comunemente utilizzati a tal fine sono l'acetato di etile, che risulta essere poco tossico, ed il diclorometano. Entrambi sono facili da rimuovere ed hanno buona capacità di solubilizzare i polimeri. Altri solventi utilizzati sono l'acetonitrile ed il cloroformio che presentano però una certa tossicità rispetto ai precedenti.

Quando deve essere incorporato un farmaco, tali solventi possono essere utilizzati in miscela, e quella più comunemente utilizzata è la miscela diclorometano/alcol (etanolo, metanolo o glicole propilenico) [Zambaux *et al.*, 1999]. Gli *agenti stabilizzanti* hanno un ruolo fondamentale nella preparazione di nanoparticelle in quanto, oltre a svolgere una funzione stabilizzante, influenzano anche le caratteristiche finali di dimensione e forma dei sistemi particellari ottenuti.

In qualità di tensioattivi la loro funzione è quella di formare un sottile strato protettivo per le gocce di fase organica disperse, disponendosi all'interfaccia o/w e stabilizzare l'emulsione. Gli stabilizzanti che vengono più comunemente impiegati sono i tensioattivi anionici e cationici, e i colloidi idrofili. Il più utilizzato tra questi ultimi, è sicuramente il PVA, seguito da PVP, alginati, gelatina, metilcellulosa e lecitina [Sahoo *et al.*, 2002].

Il *principio attivo* deve essere poco solubile in acqua, ma solubile nel solvente che costituisce la fase interna organica. Nel caso di farmaci insolubili nel solvente organico, essi devono essere polverizzato o micronizzato al fine di ottenere una distribuzione omogenea di farmaco all'interno delle microsfele risultanti [Bilati *et al.*, 2005].

In generale, possono essere utilizzate emulsioni semplici quali olio/acqua (o/w) e olio/olio (o/o), o multiple, quali acqua/olio/acqua (w/o/w) e solido/olio/acqua (s/o/w).

Emulsioni semplici O/W - In questo metodo, la fase organica contenente il polimero ed il principio attivo è emulsionata con la fase acquosa che contiene gli agenti stabilizzanti. L'evaporazione del solvente organico permette di ottenere micro- e nanoparticelle [Jeffery *et al.*, 1991].

Emulsioni multiple W/O/W - Questo metodo consiste in una variazione del precedente e permette di ottenere micro - e nanocapsule. Il principio attivo, che deve essere incorporato, viene disciolto in acqua ed il polimero è disciolto in un solvente organico (fase organica). Dalla miscela di entrambe le soluzioni si ottiene la prima emulsione olio/acqua (o/w). Quest'ultima viene successivamente aggiunta lentamente ad un mezzo acquoso contenente il tensioattivo, e si forma un'emulsione multipla del tipo w/o/w. Successivamente, il solvente organico è rimosso portando alla formazione di nano particelle.

1.4.3 Composizione delle nanoparticelle polimeriche

I polimeri sintetici possiedono proprietà molto vantaggiose come biocompatibilità, biodegradabilità e la possibilità di effettuare modificazioni e funzionalizzazioni superficiali [Rawat *et al.*, 2006]. Questo permette di controllare la farmaco-cinetica del farmaco incorporato all'interno delle Nanoparticelle. Per questo motivo i polimeri sono tra le sostanze più utilizzate per il *drug delivery*.

Ad esempio, il poli- ϵ -caprolattone (PCL), un polimero insolubile biocompatibile, è stato utilizzato per la sintesi di nanoparticelle PEG-ilate per il trasporto di farmaci anti-infiammatori non steroidei o di chemioterapici [Park *et al.*, 2005]. Nanoparticelle a base di PCL, modificate mediante l'aggiunta di polietilenossido (PEO), polimero idrofilico, sono capaci di incorporare molecole idrofobiche come il tamoxifene e sono state testate con successo su modelli murini di carcinoma della mammella [Shenoy *et al.*, 2005].

I polimeri ottenuti dalla polimerizzazione dell'acido lattico (PLA) e dall'acido glicolico (PGA), ed in particolare il copolimero acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), sono sicuramente tra i più utilizzati per la preparazione di nanoparticelle applicate al *drug delivery* [Panyam *et al.*, 2003]. Variando le caratteristiche dei polimeri di partenza, il tipo di polimeri usati ed il loro rapporto come il peso molecolare, nonché le proprietà delle nanoparticelle ottenute quali la dimensione, la porosità e le condizioni di sintesi, è possibile creare sistemi per il *drug delivery* con varie proprietà e varie cinetiche di degradazione. Questi polimeri possiedono degli

ottimi livelli di biocompatibilità e biodegradabilità, e sono stati pertanto approvati per uso umano dalla Food and Drug Administration. All'interno dell'organismo, il legame estereo presente in tali polimeri è soggetto ad idrolisi. I prodotti della reazione, gli acidi lattico e glicolico, risultano atossici e vengono eliminati attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici sotto forma di biossido di carbonio ed acqua [Jain, 2000; Panyam *et al.*, 2003]. La velocità di formazione dei prodotti di degradazione è inoltre molto ridotta, e non interferisce con le normali funzioni cellulari [Shive *et al.*, 1997]. La sicurezza di questi polimeri è stata ampiamente dimostrata in studi in vivo e sono già correntemente utilizzati per dispositivi medici quali suture riassorbibili, impianti ossei e contraccettivi, e scaffolds per ingegneria tissutale [Langer, 1995; Matsusue *et al.*, 1995]. Le applicazioni delle nanoparticelle costituite da PLGA e PLA sono molteplici, come il trasporto di estrogeni [Hariharan *et al.*, 2006], il rilascio di farmaci attraverso la barriera emato-encefalica [Costantino *et al.*, 2005], il targeting delle cellule dendritiche [Elamanchili *et al.*, 2004]. Le nanoparticelle sono state utilizzate nel trasporto del desametasone [Panyam *et al.*, 2004], ed ottimi risultati si sono avuti nel trasporto di vari chemioterapici. Nanoparticelle sono state utilizzate, ad esempio, per il trasporto del paclitaxel, un farmaco insolubile che richiede l'utilizzo di un adiuvante chiamato "Cremophor EL", responsabile di seri effetti collaterali [Dorr, 1994; Koziara *et al.*, 2006], del 5-fluorouracile [Bhadra *et al.*, 2003], e della Doxorubicina. Il PLGA è stato ampiamente utilizzato per la preparazione di nanoparticelle grazie al suo periodo di degradazione facilmente controllabile (da 1 a 6 mesi), e si presta molto bene ad applicazioni per il rilascio

controllato di farmaci. Il PLA, al contrario, ha un periodo di degradazione poco flessibile, circa 12 mesi, per cui è utilizzato preferibilmente per applicazioni che richiedono stabilità nel tempo [Choi *et al.*, 2007]. E' stato dimostrato che il legame della Doxorubicina alle nanoparticelle a base di PLGA ha notevolmente migliorato l'uptake del farmaco da parte di cellule di epatocarcinoma umano [Yoo *et al.*, 2000]. Questi studi, che fino ad ora hanno fornito risultati molto promettenti, dimostrano che nanoparticelle biodegradabili a base di PLGA rappresentano un ottimo strumento per il trasporto di farmaci ad organi sede di tumore.

1.5 Nanosistemi in uso ed in sperimentazione clinica

La **Figura 1.11** mostra l'andamento del numero degli articoli scientifici riguardanti i principali sistemi nanotecnologici (ricerca effettuata su PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) unitamente alla data di immissione in commercio prevista dalla FDA.

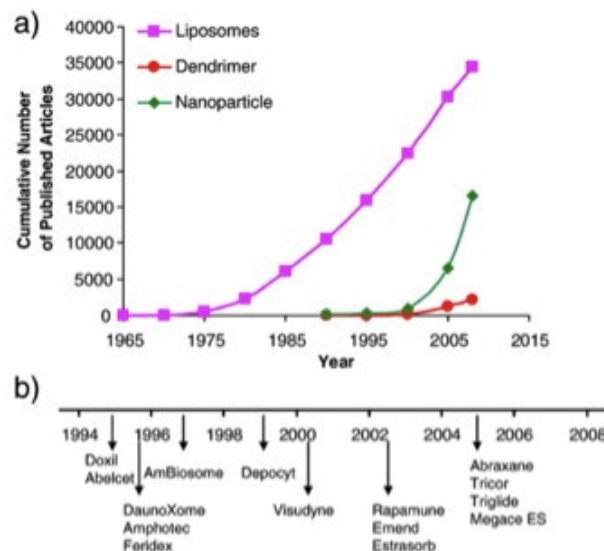


Figura 1.11: a) Numero di articoli scientifici pubblicati nel campo della nanomedicina dal 1965 ad oggi. b) Date di approvazione di alcuni sistemi nanostrutturati da parte dell'FDA.

Come è possibile osservare tra il 1965 ed il 2008, il numero di articoli scientifici relativi ai liposomi è aumentato costantemente negli anni, sino ad arrivare a 35000 articoli pubblicati (dato relativo all'anno 2005), questo aumento sostanzialmente riflette il numero dei prodotti a base di liposomi approvati negli Stati Uniti da parte dell'FDA dal 1995 in poi [McCarthy *et al.*, 2005].

Ad oggi sono numerosi drug delivery systems per la veicolazione di farmaci in fase di sperimentazione pre-clinica o clinica (**Tabelle 1, 2, 3**) tra i quali nanoparticelle polimeriche, nanoparticelle d'oro, micelle, dendrimeri, emulsioni e liposomi.

Tabella 1: formulazioni a base di liposomi in uso clinico ed in fase di sviluppo clinico.

Prodotto	Stato	Carico	Indicazioni
Daunoxome	Mercato	Daunorubicina	Cancro
Doxil / Caelix	Mercato	Doxorubicina	Cancro
Myocet	Mercato	Doxorubicina	Cancro
Ambiosome	Mercato	Anfotericina B	Infezione da funghi
Amphotech	Mercato	Anfotericina B	Infezione da funghi
Diprivam	Mercato	Propofol	Anestetico
Depocyt	Mercato	Citarabina	Meningite
INGN – 401	Fase I	Gene FUS-1	Cancro

SGT-53	Fase I	Gene p53	Cancro
--------	--------	----------	--------

Sistemi di drug delivery nanoparticellare sono già comparsi sul mercato a partire dal novembre 1995 quando venne commercializzato da parte di Shering-Plough il primo sistema liposomiale per la veicolazione della doxorubicina idrocloruro denominato **Doxil** [U.S. Patent No. 5,013,556 Issued Nov. 1995] (**Figura 1.12**).



Figura 1.12: Doxil, doxorubicina idrocloruro incapsulata all'interno di liposomi stealth

Il Doxil, commercializzato anche col nome di CAELYX, contiene una soluzione di doxorubicina incapsulata all'interno di liposomi Stealth con dimensioni di circa 85 nm (somministrabili mediante infusione endovenosa) costituiti da N-(carbonilmetossipropilene glicol 2000)-1,2-distearoil-sn glicero-3-fosfoetanolamine sodium salt (MPEG-DSPE), fosfatidilcolina di soia idrogenata (HSPC) e colesterolo (CHOL) [Allen, 2002; Torchilin, 2005]. Molto efficace nel sarcoma di Kaposi, tumore al polmone, tumore mammario metastatico ed altri tipi di carcinoma.

Tabella 2: Nanostrutture come Agenti di contrasto e trasporto di farmaci in uso clinico ed in fase di sviluppo clinico.

Prodotto	Composto	Stato	Uso
Agenti di contrasto			
Endorem	Particelle superparamagnetiche di ossido di ferro	Mercato	Agente MRI
Gadomer	Agenti MRI basati sui dendrimeri	Fase III	Agenti MRI cardiovascolare
Nanoparticelle Polimeriche per il rilascio di farmaci			
Abraxane	Nanoparticelle di albumina contenenti Paclitaxel	Mercato	Cancro al seno
Docetaxel-PNP	Nanoparticelle di PLGA contenenti Docetaxel	Fase I	Cancro prostatico
Nanoparticelle per il rilascio di materiale genetico			
CALAA-01	Nanoparticelle polimeriche contenenti siRNA	Fase I	Cancro
Nanoshell	Nanoparticelle di silice rivestite d'oro	Fase I	Cancro

Auroshell			
Aurimmune	Nanoparticelle d'oro	Fase II	Cancro
Micelle polimeriche per il rilascio di farmaci			
NK-911	Micelle PEG-Ac. poliaspartico Doxorubicina	Fase I / Fase II	Cancro
NK-105	Micelle PEG-Ac. poliaspartico Paclitaxel	Fase II	Cancro
NK-012	Micelle PEG-Ac. poliaglutammico SN-38	Fase II	Cancro
Genexol-PM	Micelle metossipolietilenglicole- acido polilattico (mPEG-PLA) contententi Paclitaxel	Fase II in USA, approvato in Sud Korea	Cancro

Abraxane [*U.S. Patent No. 6,096,331 Issued Aug. 2000*], invece, è stato approvato ed immesso in commercio solo recentemente (2005) da AstraZeneca utilizzato nel trattamento del tumore mammario refrattario ad altre forme di trattamento [*Jain, 2005*] (**Figura 1.13**).

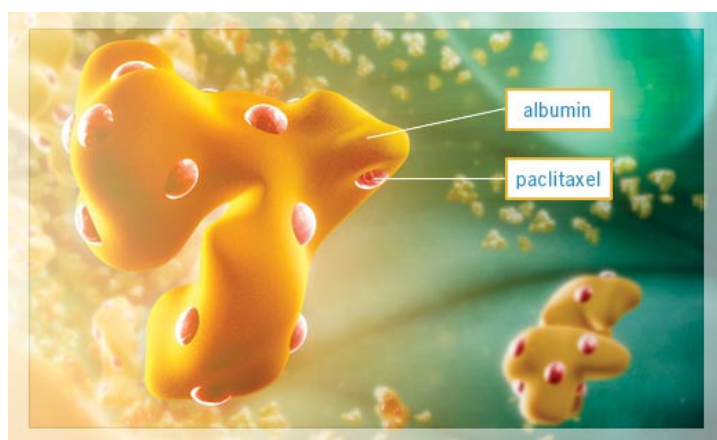


Figura 1.13: Struttura schematica delle nanoparticelle di Abraxane

Si tratta di un sistema costituito da nanoparticelle polimeriche di albumina in grado di veicolare ed incorporare Paclitaxel; viene somministrato tramite infusione endovenosa della durata di 30 minuti e, diversamente dalla formulazione standard di Taxol (Soluzione per infusione di Paclitaxel 6mg/ml), non contiene solventi come il Cremophor che generalmente determina ipersensibilizzazione da parte del paziente, per tale motivo non richiede il pretrattamento con steroidi ed antistaminici [Green, 2006; Micha, 2006]. Per tale motivo gli effetti collaterali causati dai solventi possono essere evitati, conducendo ad un profilo di tollerabilità migliore che si traduce nella possibilità di somministrare dosaggi più elevati di Paclitaxel.

Dai dati presenti sul sito web dell'azienda, Abraxane ha dimostrato un tasso di risposta clinica maggiore del doppio rispetto al Taxol in uno studio randomizzato condotto su 460 pazienti (www.abraxane.com).

Un altro esempio di sistemi nanostrutturato al momento in sperimentazione clinica è quello sviluppato da “Calando Pharmaceuticals, Inc.” denominato **Rondel / CALAA-01 (Figura 1.14)** [U.S. Patent No. 6,509,323 issued Jan., 2003].

Si tratta di un sistema costituito da nanoparticelle in grado di veicolare piccole molecole di RNA (siRNA) capaci di spegnere i geni coinvolti nell'insorgenza di numerosi tumori [Derek et al., 2008; Suzie Hwang Pun and Davis, 2002].

Il sistema è costituito da tre componenti:

1.

Introduzione

- il backbone polimerico policationico, essenziale per l'interazione elettrostatica con l'RNA caricato negativamente, portante in catena laterale residui di ciclodestrine.
- catene di PEG covalentemente legate ad una molecola altamente idrofobica (adamantano) capace di interagire con i residui ciclodestrinici.
- catene di PEG-adamantano al quale sono legati residui che conferiscono selettività per specifici tessuti tumorali.

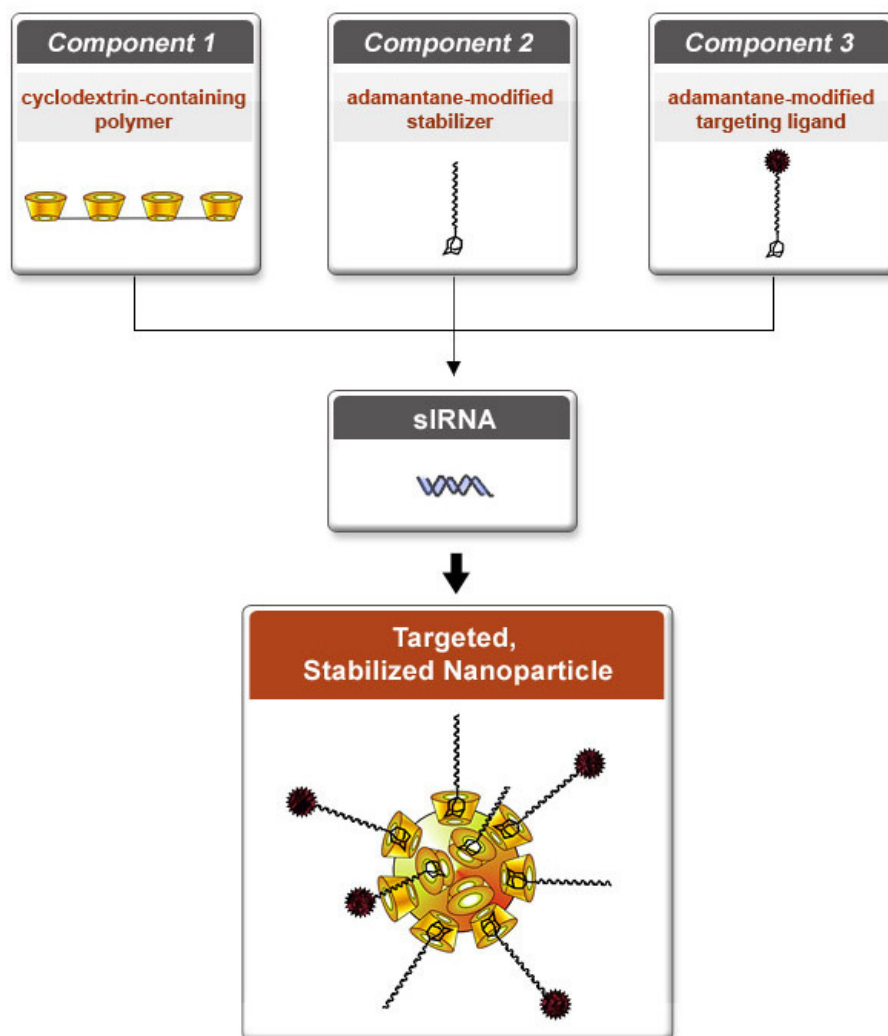


Figura 1.14: Schema riassuntivo delle componenti costitutive del sistema Rondel

I sistemi ottenuti possiedono un diametro di 50 nm che li rende somministrabili per via endovenosa. La shell di polietilenglicole, inoltre, inibisce l'attivazione del sistema reticolo-endoteliale.

AuroShell (Figura 1.15) [*U.S. Patent No. 6,645,517 issued Nov., 2003*] ha ottenuto l'autorizzazione da parte dell'FDA per i trial di sperimentazione clinica nel trattamento di alcuni tumori della testa e del collo. Il sistema AuroShell rappresenta un nuovo sistema particellare costituito da un core dielettrico in Silicio rivestito di uno strato ultra-sottile d'oro. Tali sistemi, che riescono ad accumularsi per effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention) a livello tumorale, sono capaci di scaldarsi qualora esposti ad una luce nel vicino infrarosso. Una volta somministrate per infusione endovenosa, proiettando un raggio laser sul sito tumorale dall'esterno del corpo, l'area attorno alle nanoparticelle si scalda e il tumore si surriscalda sino a temperature maggiori di 45°C determinando la morte cellulare [*Oldenburg, 1999; Loo, 2004;*].



Figura 1.15: Sacca da infusione endovenosa contenente una dispersione colloidale di AuroShells

L'azienda produttrice (Nanospectra Biosciences) sostiene che la tecnologia possa essere sfruttata per molti tumori solidi incluso il cancro alla prostata, mammella e polmone.

NK911 (Figura 1.16) [Nakanishi T. *et al.*, 2001] è un nuovo sistema micellare, al momento in Fase I di sperimentazione clinica, progettato per il delivery della Doxorubicina e costituisce uno dei sistemi più promettenti per la veicolazione di questo antitumorale [Matsumara *et al.*, 2004].

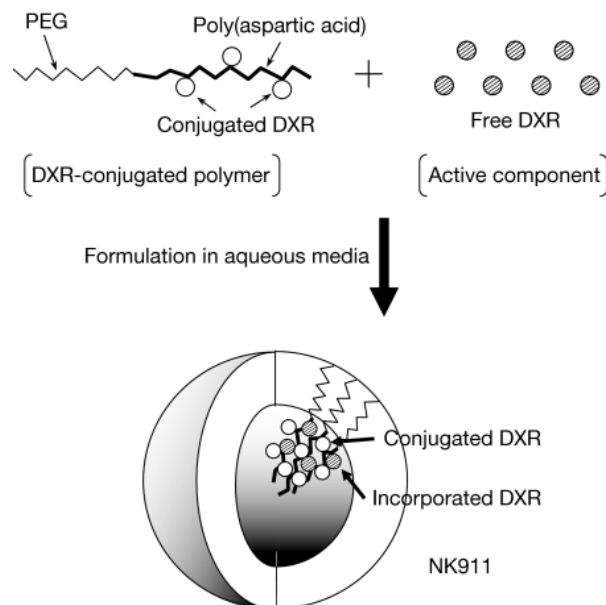


Figura 1.16: struttura schematica della micella NK911

Il backbone polimerico della struttura micellare è costituito da un copolimero a blocchi contenente PEG (Peso molecolare 5000 Da) e Acido poliaspartico (circa 30 unità) coniugato con la Doxorubicina. La presenza del PEG 5000 consente la formazione, in ambiente acquoso, della shell idrofilica esterna, mentre la struttura altamente idrofobica costituita dal coniugato Acido Poliaspartico-Doxorubicina ne costituisce il core. La struttura micellare ottenuta possiede, inoltre, un diametro di 40 nm [Nakanishi *et al.*, 2001]. Al momento sono in corso studi di Fase II per il trattamento del cancro pancreatico metastatico.

Tabella 3: Polimeri terapeutici nel mercato o presenti in fase di sviluppo clinico

Composto	Nome	Stato	Indicazioni
Farmaci polimerici			
Poli (alanina, lisina, acido glutamico, tirosina)	Copaxone	Mercato	Sclerosi Multipla
Destrina-2-solfato	Emmelle	Mercato	Fase III HIV – terapia antivirale contro HIV (gel)
Destrina-2-solfato		Fase III	Terapia anti-HIV per via intraperitoneale
Poli (I):Poli(C)	Ampligen	Fase III	Disfunzione immunitaria da fatica cronica
SPL7013 (dendrimero polilisina)	VivaGel	Fase I/II	Malattie virali trasmesse sessualmente (gel vaginale)

Coniugati polimero-oligonucleotide			
PEG-aptamer	Macugen	Mercato	Degenerazione maculare legata all'età
Coniugati polimero proteina			
PEG-adenosina deaminasi	Adagen	Mercato	Sindrome grave da immunodeficienza
SMANCS	Zinostain Stimalmer	Mercato	Cancro – carcinoma epatocellulare
PEG-L-asparaginasi	Oncaspar	Mercato	Leucemia linfoblastica acuta
PEG- α -interferone 2b	PEG-intron	Mercato	Epatite C, e in sviluppo clinico per cancro, sclerosi multipla, HIV
PEG- α -interferone 2°	PEG-Asys	Mercato	Epatite C
PEG-ormone della crescita umano	Pegvisomant	Mercato	Acromegalia
PEG-GCSF	CDP870	Fase III	Artriti reumatoidi e morbo di Crohn
Coniugati polimero-farmaco			
Poliglutammato-paclitaxel	CT-2103 XYOTAX	Fase II/III	Cancro – in particolare cancro del polmone, delle ovaie e dell'esofago
HPMA Copolimero-doxorubicina	PK1; FCE28068	Fase II	Cancro – in particolare cancro del polmone e del seno
HPMA Copolimero-doxorubicina	PK2; FCE28069 Galactosamine	Fase I/II	Cancro – in particolare carcinoma epatocellulare
HPMA	PNU166945	Fase I	Cancro

Copolimero-paclitaxel			
HPMA	MAG-CPT	Fase I	Cancro
Copolimero-camptotecina	PNU166148		
HPMA	AP5280	Fase II	Cancro
Copolimero-platinato			
HPMA	AP5346	Fase I/II	Cancro
Copolimero-platinato			
Poliglutammato camptotecina	CT-2106	Fase I/II	Cancro
PEG-camptotecina	PROTHEOCAN	Fase II	Cancro

VivaGel (Figura 1.17) [*U.S. Patent No. 5,714,166 Issued Feb., 1998*], prodotto da Starpharma Holdings, è un gel vaginale microbicida contenente nanostrutture dendrimeriche utilizzato nel trattamento dell'Herpes Genitale, nella prevenzione dell'HIV e nei casi di Papilloma Virus.

I dendrimeri sono composti polimerici dotati di una geometria altamente ordinata, la cui caratteristica fondamentale è quella di possedere un elevato grado di ramificazioni al loro interno [McCarthy, 2005]. Ciò rende possibile numerose applicazioni, in particolare come matrici in sistemi per il rilascio in condizioni controllate di farmaci. VivaGel ha completato al momento la Fase I di sperimentazione clinica e sono iniziati recentemente trial di Fase II.

1.

Introduzione



Figura 1.17: Immagine relativa al prodotto VivaGel

2. SCOPO DELLA TESI

Già da diversi anni, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio triennio di tesi di dottorato, si è orientato verso la sintesi di copolimeri poliamminoacidici che possano trovare impiego nel campo dei biomateriali per scopi biomedici.

In particolare è stato utilizzato da questo gruppo, quale materiale di partenza, un polimero a struttura poliamminoacidica derivato dalla polisuccinimide (PSI), a sua volta ottenuta per policondensazione termica dell'acido D,L-aspartico.

Si tratta dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) (**Figura 2.1**), ottenuta mediante una semplice reazione standardizzata, per apertura degli anelli succinimmidici della PSI con etanolammina.

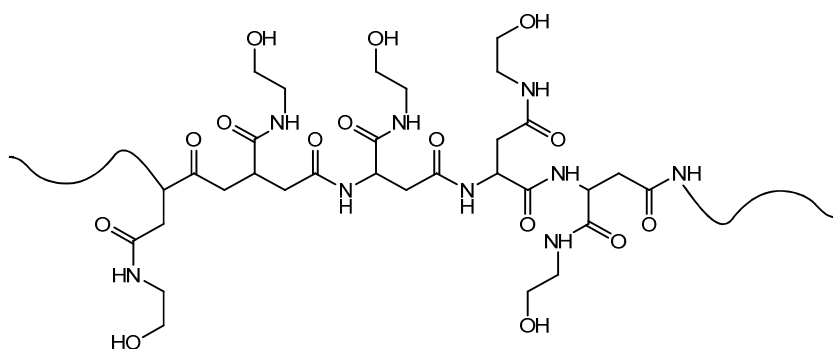


Figura 2.1: Rappresentazione schematica del PHEA

Numerosi studi hanno evidenziato le eccellenti proprietà del PHEA, come l'elevata solubilità in mezzo acquoso e l'assenza di tossicità, antigenicità e teratogenicità, tanto da essere proposto come plasma expander e drug carrier [*Antoni et al., 1974; Cavallaro et al., 2001; Cavallaro et al., 2004;*].

Il PHEA inoltre possiede gruppi funzionali ossidrilici, uno per ciascuna unità ripetitiva e può, di conseguenza può essere derivatizzato (mediante coniugazione ai gruppi ossidrilici) in modo tale da possedere contemporaneamente unità che ne modulano la solubilità, unità attive (molecole di farmaco) e anche gruppi in grado di orientare il copolimero verso cellule o organi bersaglio. Ne consegue che un tale sistema polimerico mostra elevata potenzialità per il superamento, da parte del farmaco, di alcune proprietà chimico-fisiche sfavorevoli quali scarsa solubilità in acqua, sfavorevole velocità di azione o sfavorevole localizzazione nell'organismo.

Queste proprietà rendono il PHEA, candidato ideale per la sintesi di nuovi copolimeri utilizzabili in ambito biomedico per la produzione di *carrier* polimerici per la veicolazione di farmaci.

I diversi copolimeri sintetizzati sono stati sfruttati per legare covalentemente sostanze biologicamente attive come farmaci, dando origine a profarmaci macromolecolari [Cavallaro *et al.*, 2001; Cavallaro *et al.*, 2004]. Sono stati preparati policationi a base di PHEA, introducendo gruppi portanti carica positiva o protonabili, per la veicolazione di materiale genetico (*gene delivery*) [Cavallaro *et al.*, 2000; Cavallaro *et al.*, 2008] nonché catene idrofobiche per la produzione di copolimeri anfifilici in grado di dare micelle o nanoparticelle polimeriche [Cavallaro *et al.*, 2003; Cavallaro *et al.*, 2004].

Viste le ottime caratteristiche di reattività chimica e di tollerabilità biologica del PHEA e la sua enorme versatilità chimica, obiettivo del mio lavoro di Dottorato è stato pertanto quello di valutare la possibilità di produrre nuovi copolimeri di tipo *graft* del PHEA e di ottenere a partire da tali copolimeri nuovi sistemi colloidali (micelle e nanoparticelle polimeriche) capaci di aumentare la biodisponibilità dei principi attivi incorporati.

Per la realizzazione delle micelle polimeriche oggetto della prima parte del mio lavoro di tesi, nella struttura del PHEA sono state

inserite catene di polietilenglicole (PEG) a diverso peso molecolare (2000 o 5000) e catene di esadecilamina (C_{16}).

I copolimeri ottenuti PHEA-PEG₂₀₀₀- C_{16} e PHEA-PEG₅₀₀₀- C_{16} sono stati opportunamente caratterizzati mediante analisi ^1H -NMR e SEC.

Essi sono stati poi impiegati per preparare micelle polimeriche attraverso il metodo della dissoluzione diretta in mezzo acquoso e i sistemi risultanti sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico in termini di concentrazione di aggregazione critica (CAC), dimensioni, distribuzione dimensionale e potenziale zeta [Cavallaro G. *et al.*, 2004].

Per valutare le potenzialità di tali micelle di agire come “*colloidal drug delivery systems*” è stato scelto come farmaco modello l’Acido Ferulico (AF) un composto naturale, costituente ubiquitario delle pareti cellulari delle piante e dotato di una spiccata attività antiossidante, utile nella neutralizzazione dei radicali liberi che si formano nei processi di metabolismo cellulare (*reactive oxygen species*, ROS) [Szocs, 2004; Ichihashi *et al.*, 2003; Rosen *et al.*, 1995]. Tale farmaco risulta efficace nel trattamento di alcune malattie neurodegenerative, quali il morbo di Parkinson e l’Alzheimer, e di alcune malattie della retina, come la degenerazione maculare [Li *et al.*,

2003; Sohn and Oh, 2003] o nel trattamento di tumori al seno [Kampa et al., 2004], al fegato [Lee, 2005], ai polmoni [Lesca, 1983], alla prostata e a quelli del tratto digerente [Ferguson et al., 2001], in quanto esplica un effetto pro-apoptotico che induce distruzione delle cellule tumorali.

L'AF è stato incorporato all'interno della struttura micellare e, dopo opportuna caratterizzazione chimico-fisica, ne è stato valutato il profilo di rilascio dalle micelle, in condizioni mimanti quelle fisiologiche.

Sono state effettuate inoltre prove di tossicità *in vitro* nei confronti di alcune linee cellulari e test emolitici su eritrociti umani allo scopo di valutare la emocompatibilità di questi sistemi.

Infine, le potenziali proprietà *stealth* delle micelle (conferite dal PEG) sono state investigate mediante un test *in vitro* in grado di evidenziare la capacità delle micelle polimeriche di sfuggire all'uptake da parte di cellule di macrofagi murini.

La sintesi di nuovi copolimeri anfifilici per la preparazione di sistemi micellari per la somministrazione topica di farmaci a livello polmonare, è stata l'oggetto di studio durante la seconda parte del mio lavoro di tesi di Dottorato.

Nello specifico ai gruppi idrossilici presenti in catena laterale al PHEA è stato legato covalentemente il fosfolipide peghilato, 1,2-Distearoil-sn-Glicerolo-3-Fosfoetanolamina-N-[Amino(PolietilenGlicole)₂₀₀₀] (DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂), ottenendo in tal modo un derivato polimerico multifunzionalizzato e peghilato (PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE). Tale reazione di derivatizzazione è stata condotta attivando i gruppi idrossilici del PHEA mediante il N,N'-Disuccinimidil carbonato (DSC).

L'utilizzo del DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ in qualità di agente idrofobizzante, è dettata dal fatto che, micelle polimeriche, costituite da unimeri aventi porzioni idrofobiche di natura fosfolipidica, possiedono elevata stabilità per l'esistenza di due catene di acidi grassi in ogni residuo fosfolipidico [Torchilin, 2007].

Il copolimero *graft* così ottenuto è stato opportunamente caratterizzato in termini di analisi FT-IR, ¹H-NMR e SEC, ed è stata appurata la sua capacità di auto-aggregazione in acqua a basse concentrazioni. In particolare, la formazione di micelle di tipo *core-shell* è stata confermata da studi di fluorescenza, e successivamente le micelle ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni medie, potenziale zeta e morfologia.

Sulla base delle ben note capacità dei *nanocarrier*, come le micelle polimeriche, di solubilizzare una buona quantità di farmaci idrofobici, di sfuggire alla fagocitosi, grazie al loro guscio idrofilo e di passare attraverso lo strato mucoso associato alle malattie infiammatorie [Gaber *et al.*, 2006], sono state valutate le potenzialità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE come DDS per la somministrazione polmonare di glucocorticoidi, come il Beclometasone dipropionato (BDP) [Marsh *et al.*, 2003; Gaber *et al.*, 2006; Smola *et al.*, 2008].

La scelta di questo tipo di farmaco è stata dettata, inoltre, dal fatto che i trattamenti delle malattie infiammatorie bronchiali falliscono spesso a causa della scarsa capacità di tali farmaci di penetrare attraverso lo strato mucoso per arrivare al sito d'azione, per cui risulta necessario somministrare alte dosi, che risultano poi mal tollerate o addirittura tossiche.

Inoltre, la veicolazione di un corticosteroide mediante *nanocarrier* aventi nella propria struttura fosfolipidi può, in linea di principio, incrementare il rilascio del farmaco a livello polmonare, sfruttando l'attività idrolitica dovuta alla presenza di un'elevata concentrazione di fosfolipasi A2 nei tessuti infiammati. Ciò comporterebbe una parziale degradazione dei copolimeri componenti la micella

polimerica con conseguente rilascio del farmaco [*Davidson et al., 2001; Vermehren, 2001; Gaber et al., 2006*].

Infine, sono stati realizzati sulle micelle ottenute, dei test in vitro per valutare gli effetti di tali sistemi sulla vitalità cellulare sia in presenza che in assenza di farmaco e la capacità dei *nanocarrier* di migliorare l'ingresso del farmaco nelle cellule epiteliali bronchiali umane (16 HBE).

Infine scopo della terza parte del mio lavoro di tesi di Dottorato è stato quello di preparare e caratterizzare nuove nanoparticelle polimeriche ottenute da copolimeri anfifilici del PHEA.

Allo scopo di sintetizzare i copolimeri necessari alla preparazione di nanoparticelle polimeriche, il PHEA è stato funzionalizzato con polietilenglicole (PEG) e/o acido polilattico (PLA) per ottenere, rispettivamente, i copolimeri *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA e PHEA-PLA.

Il PLA è stato scelto in questo studio poiché è un polimero lipofilo di sintesi, approvato dalla FDA, nonché favorito in molte applicazioni di implicazione biomedica in quanto bioassorbibile, non tossico e biodegradabile [*Lassalle and Ferreira, 2007*]. Inoltre, la reazione con il PHEA permette di ottenere copolimeri *graft*. Il *grafting* del PLA ad

un polimero solubile in acqua quale il PHEA può rappresentare un valido approccio per modificare le proprietà strutturali e funzionali di entrambi i copolimeri.

La reazione di derivatizzazione del PHEA è stata effettuata utilizzando il PLA previamente attivato con 1,1-carbonildiimidazolo (CDI).

Una volta ottenuti, i copolimeri *graft* PHEA-PLA e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA essi sono stati purificati e caratterizzati mediante analisi ¹H-NMR, FT-IR e SEC, e sono stati utilizzati quale materiale di partenza per la preparazione di nanosistemi mediante la tecnica dell'omogeneizzazione ad elevata pressione e successiva evaporazione del solvente. L'utilizzo di copolimeri anfifilici ha permesso di ottenere nanoparticelle senza aggiungere tensioattivi o agenti stabilizzanti alla pre-emulsione.

Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico mediante determinazione delle dimensioni medie, eseguita sia prima che dopo il processo di liofilizzazione, e attraverso Microscopia a Scansione Elettronica (SEM).

Al fine di dimostrare la presenza del PEG e/o del PHEA sulla superficie delle nanoparticelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA e PHEA-PLA

sono state inoltre eseguite misure di potenziale zeta e di Spettroscopia Elettronica a raggi X (XPS).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE (I PARTE)

3.1 Sintesi dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆

La prima parte del lavoro di Dottorato è stato dedicato alla sintesi di due copolimeri *graft* del PHEA, in particolare del PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e del PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, al fine di ottenere due polimeri anfifilici, contenenti in catena laterale, porzioni idrofiliche di PEG₂₀₀₀ e porzioni idrofobiche di acido palmitico (C₁₆). La sintesi dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è stata effettuata, secondo una procedura già messa a punto presso il laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di Dottorato [Cavallaro *et al.*, 2003], mediante tre step successivi:

- ✓ Parziale aminolisi di una polisuccinimide (PSI) con O-(amminoetil)-O'-metil(polietilen glicole) (M_w 2000 o 5000), per ottenere i copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀ e PSI-PEG₅₀₀₀ (**Figura 3.1**);

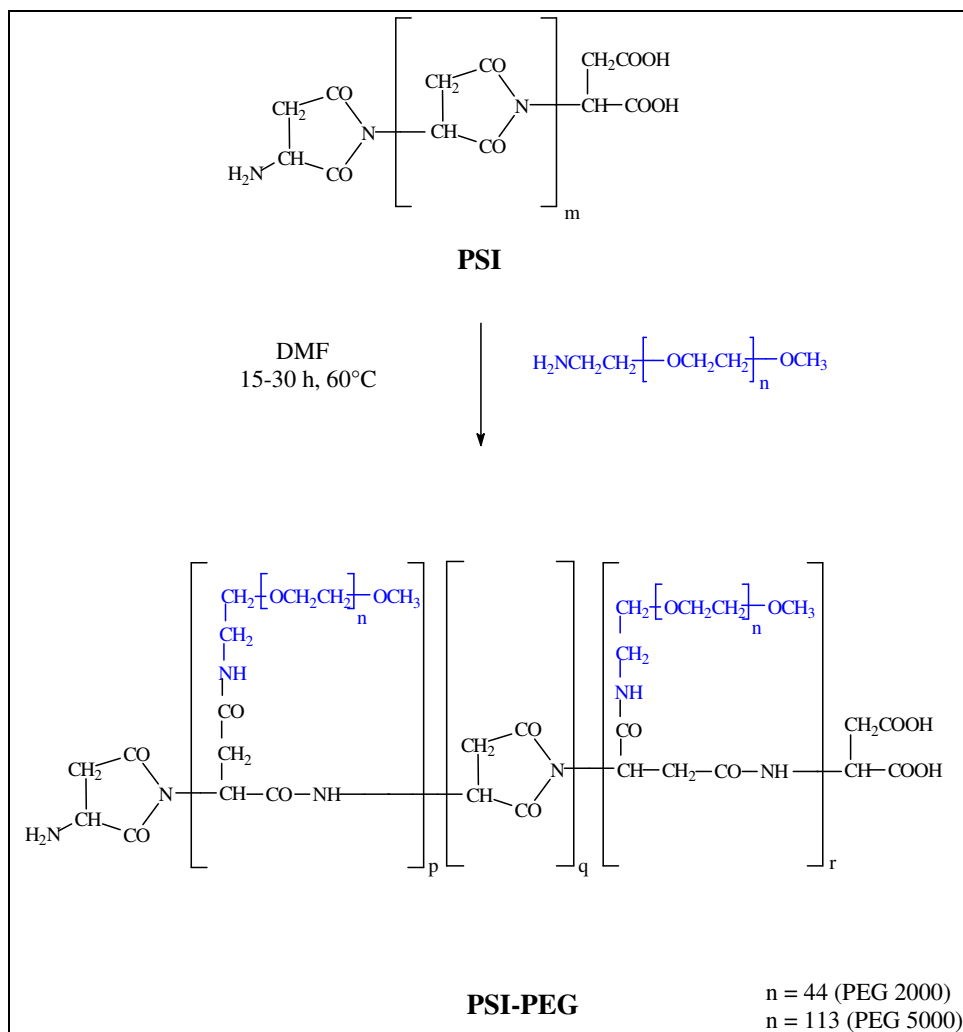


Figura 3.1: Rappresentazione schematica della sintesi dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀ o PSI-PEG₅₀₀₀.

- ✓ Parziale aminolisi dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀ e PSI-PEG₂₀₀₀ con esadecilamina per ottenere rispettivamente i copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PSI-PEG₅₀₀₀-C₁₆ (**Figura 3.2**);

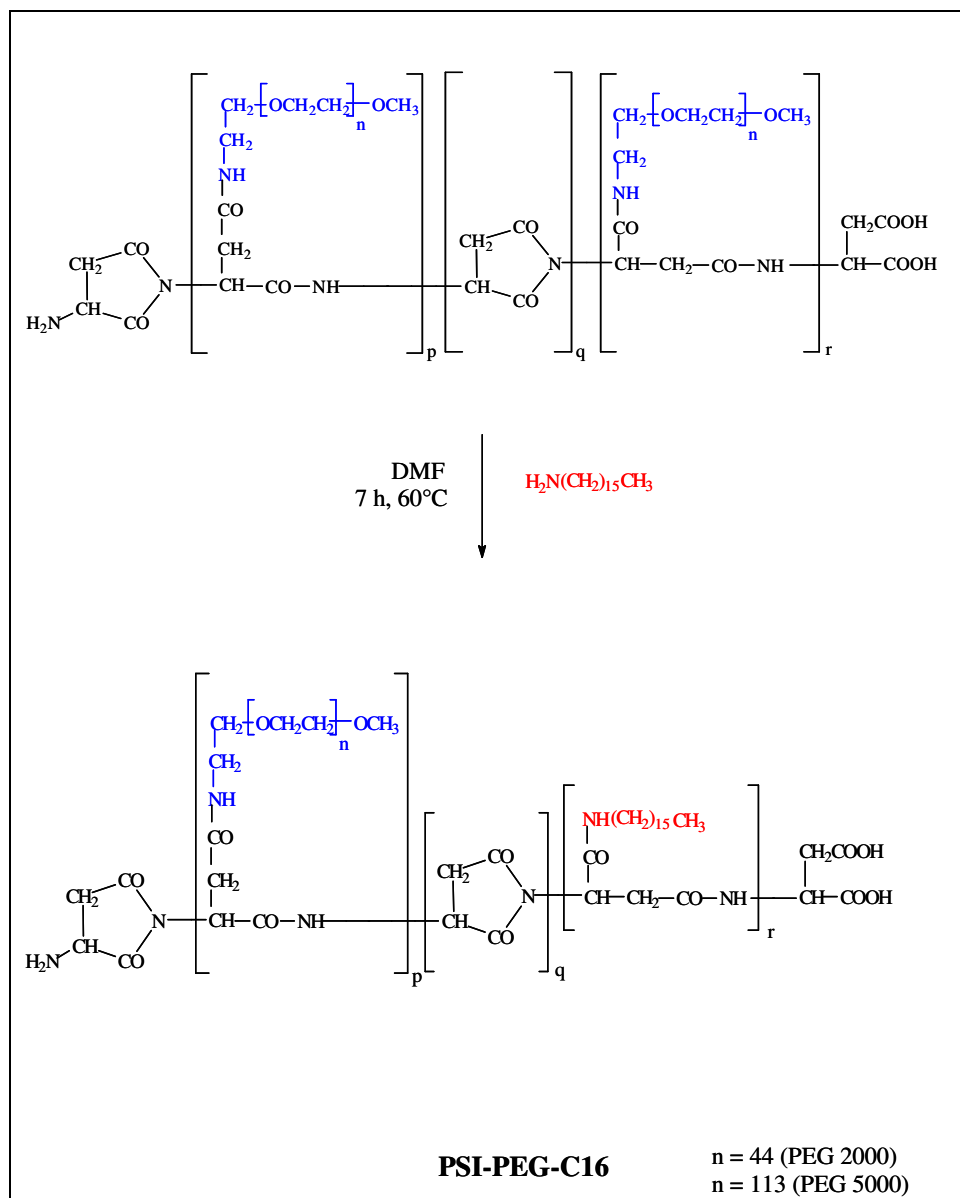


Figura 3.2: Rappresentazione schematica della sintesi dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PSI-PEG₅₀₀₀-C₁₆

- ✓ Totale aminolisi degli anelli succinimmidici dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PSI-PEG₅₀₀₀-C₁₆ mediante etanolamina, per ottenere i copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ (**Figura 3.3**).



Figura 3.3: Struttura schematica del copolimero PHEA-PEG-C₁₆

I copolimeri così ottenuti, purificati mediante dialisi e liofilizzati, sono stati caratterizzati mediante analisi ^1H -NMR. In **Figura 3.4** è riportato, come esempio, lo spettro ^1H -NMR del PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in D₂O.

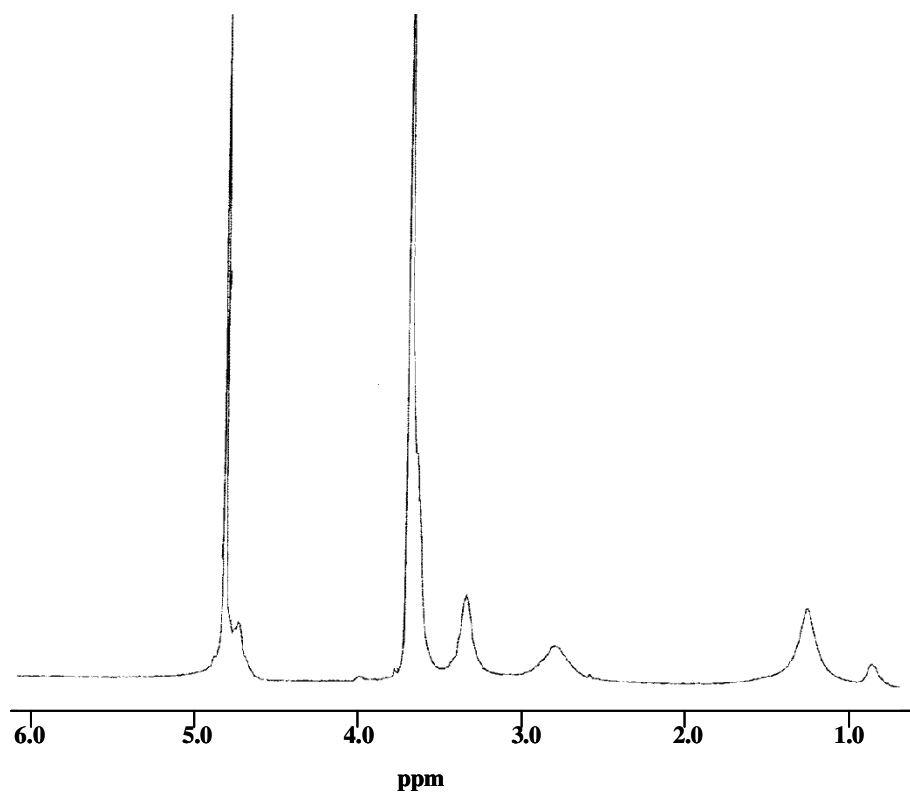


Figura 3.4: Spettro ^1H -NMR del PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in D₂O.

Il grado di derivatizzazione in PEG (DD_{PEG}), espresso come:

$$DD_{\text{PEG}} = \frac{\text{moli di PEG}}{\text{moli di unità ripetitive di PHEA}} \times 100$$

è stato determinato tramite ^1H -NMR in D₂O paragonando l'integrale del picco a δ 3.69 corrispondente ai protoni $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)-$ attribuiti al PEG legato, con l'integrale del picco a δ 2.82 relativo ai protoni $-\text{NH}-\text{CH}-(\text{CO})-\text{CH}_2-$ appartenente al PHEA.

Il grado di derivatizzazione in C₁₆ (DD_{C16}) espresso come:

$$DD_{C_{16}} = \frac{\text{moli di } C_{16}}{\text{moli di unità ripetitive di PHEA}} \times 100$$

è stato calcolato tramite $^1\text{H-NMR}$ in D_2O confrontando l'integrale del picco a δ 0.87 assegnato al $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ (o l'integrale del picco relativo ai protoni a δ 1.28 assegnato al $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) appartenenti al C_{16} , con l'integrale del picco a δ 2.82 assegnato a $-\text{NH-CH(CO)-CH}_2-$ appartenente al PHEA.

Per il PHEA-PEG₂₀₀₀- C_{16} , i valori di DD in PEG₂₀₀₀ e C_{16} sono risultati rispettivamente pari a 1.8 mol% e 10.0 mol%. Per il PHEA-PEG₅₀₀₀- C_{16} , invece, i valori di DD in PEG₅₀₀₀ e C_{16} sono stati rispettivamente di 2.0 mol% e 10.2 mol%.

I copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀- C_{16} e PHEA-PEG₅₀₀₀- C_{16} sono stati caratterizzati inoltre in termini di peso molecolare medio pesato (M_w) e indice di polidispersità (M_w/M_n). La determinazione del peso molecolare è stata effettuata mediante analisi SEC in fase organica al fine di evitare l'eventuale aggregazione dei polimeri per effetto del solvente (acqua); i valori ottenuti sono stati 17.6 kDa per il PHEA-PEG₂₀₀₀- C_{16} e 21.8 kDa per il PHEA-PEG₅₀₀₀- C_{16} .

In **Tabella 3.1** sono riportate le principali caratteristiche molecolari dei copolimeri ottenuti.

Tabella 3.1: Parametri molecolari dei copolimeriPHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆.

Campione	DD _{PEG} (mol %)	DD _{C16} (mol %)	M _w (kDa)	M _w /M _n
PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆	1.8	10.0	17.6	1.9
PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆	2.0	10.2	21.8	1.8

3.2 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆

I copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, in virtù delle loro caratteristiche anfifiliche, a contatto con un mezzo acquoso sono in grado di formare strutture micellari [Cavallaro *et al.*, 2004]. Esse dunque avranno un “*core*” costituito dalle catene idrofobe di esadecilamina (C₁₆), che funge da spazio funzionale per accogliere il farmaco idrofobo, e catene di PEG disposte sulla superficie esterna, a contatto con il mezzo acquoso, formanti la “*shell*” idrofila capace di conferire loro proprietà “*stealth*”.

L’effettiva capacità di tali copolimeri di auto-assemblarsi e formare micelle è stata valutata tramite studi di fluorescenza in presenza di pirene, il cui spettro di eccitazione, caratterizzato da 4 picchi di intensità, varia in funzione dell’intorno chimico in cui esso si trova.

Allo scopo di legare le variazioni dello spettro di eccitazione del pirene alle concentrazioni dei copolimeri in questione, sono stati calcolati i rapporti tra le intensità dei picchi I_{336} e I_{333} di tale spettro al variare delle concentrazioni di ciascun copolimero in soluzione acquosa, come mostrato in **Figura 3.4**.

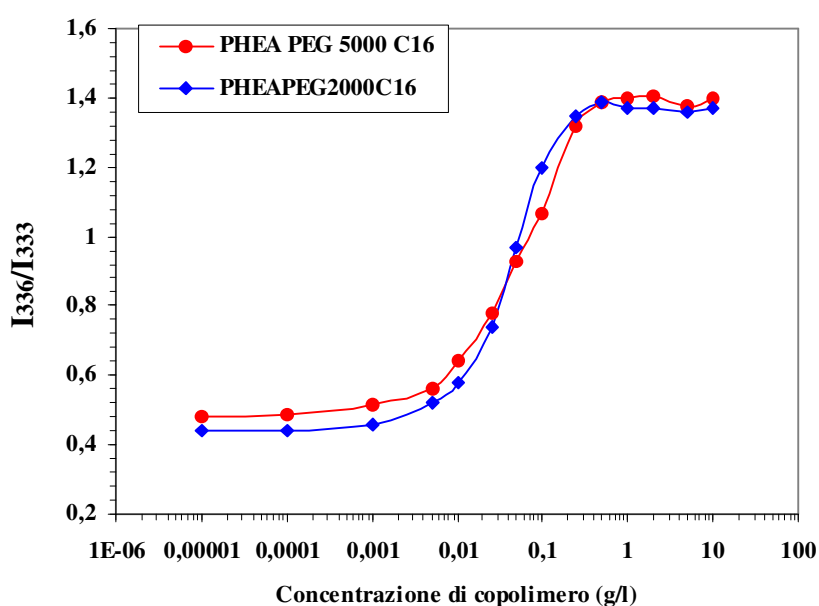


Figura 3.4: Rapporto di intensità I_{336}/I_{333} ottenuto dagli spettri di eccitazione del pirene in funzione della concentrazione di copolimero, per $\lambda_{ecc}=390$ nm. Ogni valore è la media di tre esperimenti.

Interpolando i dati ottenuti si ricavano le curve mostrate in **Figura 3.4**, a partire dalle quali possiamo ricavare graficamente i valori di CAC dei copolimeri, espressi in g/l. A tale scopo è sufficiente individuare l'intersezione tra la retta orizzontale che interpola la

sezione relativa alla parte piana inferiore della curva e la retta che interpola la sezione relativa alla parte ascendente della stessa curva.

Per le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ la CAC, calcolata con questo metodo, risulta essere pari a 0.007 g/l ($4.0 \cdot 10^{-7}$ M) e 0.004 g/l ($1.8 \cdot 10^{-7}$ M), rispettivamente (**Tabella 3.2**).

Tabella 3.2: CAC, diametro medio, PDI e potenziale zeta delle micelle di

PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆

Campione	CAC (g/l)	Diametro medio (nm)	PDI	Potenziale zeta (mV) (\pm SD)
PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆	0.007	11.02	0.32	-8.40 (\pm 5.31)
PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆	0.004	13.15	0.37	-2.16 (\pm 4.47)

Vista l'effettiva capacità dei copolimeri sintetizzati PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ di auto-assemblarsi al di sopra della CAC ($4.0 \cdot 10^{-7}$ M e $1.8 \cdot 10^{-7}$ M), l'idoneità di tali aggregati come “*colloidal drug delivery systems*” è stata valutata in via preliminare, determinandone parametri chimico-fisici importanti quali diametro

medio, distribuzione dimensionale e potenziale zeta. I risultati sono riportati in **Tabella 3.2**.

Come si può notare, entrambi i tipi di micelle hanno dimensioni dell'ordine di pochi nanometri; il diametro medio maggiore delle micelle di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è probabilmente dovuto alla maggiore lunghezza delle catene di PEG legate rispetto alle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆.

Anche il potenziale zeta risulta minore in valore assoluto per le micelle contenenti PEG a più alto peso molecolare rispetto a quelle che contengono PEG a peso molecolare inferiore (-2.16 mV per il PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contro -8.4 mV per il PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆). Anche tale differenza in termini di potenziale zeta può essere attribuita al differente peso molecolare di PEG presente in ciascun tipo di micella, che genera una maggiore schermatura della superficie delle micelle di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ rispetto a quelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆.

3.3 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti Acido Ferulico.

Allo scopo di incrementare la solubilità in acqua di farmaci idrofobi e di aumentarne l'attività farmacologica, sono già stati progettati numerosi sistemi micellari di natura polimerica, che hanno mostrato una prolungata permanenza nel circolo ematico e un rilascio lento dei farmaci in essi incorporati [Torchilin, 2007].

All'interno del laboratorio dove ho svolto il lavoro sperimentale di dottorato è già stato proposto l'utilizzo di micelle polimeriche di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ o PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ per la veicolazione di farmaci idrofobi [Cavallaro et al., 2004].

Alla luce di tali considerazioni sono stati preparati nuovi potenziali “colloidal drug delivery systems” a partire da micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ per la veicolazione dell'AF, molecola nota in letteratura per le sue innumerevoli potenzialità terapeutiche da ricondurre all'attività anti-infiammatoria e antiossidante [Srinivasan et al., 2007; Ono et al., 2004], ma dotato di relativamente bassa emivita [Zhao and Moghadasian, 2008].

Le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti AF sono state preparate secondo il metodo descritto in letteratura e riportato nella parte sperimentale [Cavallaro et al., 2004].

I sistemi così ottenuti sono stati caratterizzati dal punto di vista tecnologico-farmaceutico e investigati al fine di valutarne la stabilità fisica, il profilo di rilascio del farmaco in essi incorporato nei fluidi biologici e le proprietà stealth.

In **Tabella 3.3** sono riportate le caratteristiche principali delle micelle contenenti AF.

Tabella 3.3: Percentuale di farmaco caricato (Drug Loading, DL%), diametro medio, PDI e potenziale zeta delle micelle di

PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti AF.

Campione	D.L. (%)	Diametro medio (nm)	PDI	Potenziale zeta (mV)(±SD)
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ / AF	23	14.92	0.25	-10.21 (±4.98)
PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ / AF	20	18.61	0.26	-5.24 (±4.70)

La quantità di AF incorporato nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è stata valutata tramite analisi HPLC e UV. Tale valore espresso come *Drug Loading* (DL%), ovvero il rapporto percentuale in peso tra il farmaco incorporato e il sistema totale (micella + farmaco), è risultato essere pari al 23% p/p per il PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e al 20% p/p per il PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆. Tali valori elevati

possono essere spiegati considerando sia l'elevata affinità di tale farmaco per il *core* delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ sia il verificarsi di un parziale adsorbimento di AF sulla superficie delle micelle durante la fase di preparazione.

Successivamente, le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti AF sono state anche caratterizzate in termini di diametro medio, PDI e potenziale zeta, e tali valori sono riportati in **Tabella 3.3**.

Come è possibile osservare, la presenza del farmaco determina un lieve incremento nel diametro medio delle micelle rispetto alle micelle vuote.

I valori ottenuti, 14.9 e 18.6 nm rispettivamente per le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, sono comunque tali da considerare tali micelle idonee alla somministrazione anche per via endovenosa. Inoltre, i valori di potenziale zeta delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti AF sono risultati più negativi rispetto a quelli ottenuti con le micelle vuote. Tale risultato può essere spiegato ipotizzando un parziale adsorbimento del farmaco, elettrolita debole di carattere acido, sulla superficie delle micelle. Tale risultato è peraltro in accordo con l'elevato contenuto di farmaco

caricato nelle micelle anche per adsorbimento superficiale come precedentemente supposto.

Allo scopo di valutare la capacità delle micelle PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ di rilasciare l'AF in esse incorporato in maniera prolungata, sono stati effettuati studi di rilascio in tampone fosfato (PBS) a pH 7.4 e in plasma umano utilizzando il metodo della dialisi. Le micelle contenenti AF sono state disperse nel mezzo opportuno (PBS o plasma) e successivamente trasferite in un tubo da dialisi (vedi **Figura 3.5**).



Figura 3.5: Trasferimento all'interno della membrana da dialisi della dispersione di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti AF in plasma umano.

La dialisi, successivamente, è stata immersa nello stesso mezzo (PBS o plasma) e ad intervalli di tempo predeterminati sono stati condotti dei prelievi al fine di determinare la quantità di AF rilasciata dalle micelle, in funzione del tempo di incubazione. Inoltre, è stato determinato il profilo di diffusione di AF libero attraverso la membrana da dialisi nei mezzi scelti per assicurarsi che la membrana da dialisi non interferisca con la libera diffusione del farmaco.

In **Figura 3.6** sono riportati i profili di rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in PBS a pH 7.4 e in plasma umano

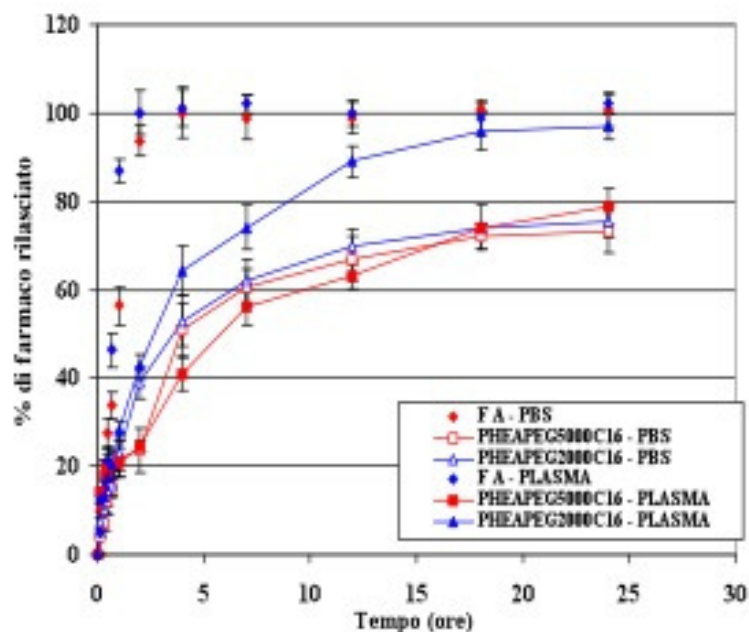


Figura 3.6: Profili di rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, e profili di diffusione dell'AF libero in PBS a pH 7.4 e plasma umano, a 37°C.

La quantità di AF rilasciata durante lo studio è stata espressa come percentuale del rapporto in peso di farmaco rilasciato rispetto alla quantità totale di farmaco contenuta nelle micelle.

Gli studi condotti in PBS a pH 7.4 hanno dimostrato l'effettiva capacità che tali sistemi hanno di liberare il farmaco, in maniera prolungata. Infatti il rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ pari, dopo 24 ore di incubazione è pari al 75.3% p/p e 73% p/p rispettivamente per i due sistemi micellari. Inoltre il profilo di rilascio del farmaco risulta simile per entrambi i sistemi.

Al contrario, in plasma umano i profili di rilascio dell'AF dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ sono differenti risultando il rilascio dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ più veloce rispetto a quello ottenuto con dalle micelle di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆. Inoltre dopo 24 ore praticamente tutto il farmaco incorporato viene rilasciato dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, mentre ne resta non rilasciato circa il 20% nel caso delle micelle di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆. Probabilmente, il più lento rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ può essere spiegato da una diversa interazione del sistema con i componenti plasmatici, rispetto al PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆.

Inoltre, le più piccole dimensioni delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ potrebbero determinare una più rapida diffusione del farmaco dalle micelle, tenuto conto che, come detto, il rilascio del farmaco da micelle polimeriche può avvenire anche per diffusione del farmaco stesso dal nucleo idrofobico del carrier verso la fase acquosa del mezzo esterno [Kim *et al.*, 2008].

3.4 Stabilità delle micelle.

Allo scopo di valutare la stabilità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, vuote e contenenti AF, alla conservazione e in condizioni mimanti quelle fisiologiche, sono stati effettuati degli esperimenti secondo una procedura riportata in letteratura [Dabholkar, 2006].

La stabilità è stata valutata su tali campioni confrontando dimensioni medie, PDI e potenziale zeta prima e dopo il trattamento. Eventuali alterazioni di AF, alle condizioni sperimentali scelte sono state valutate mediante analisi HPLC e UV.

In particolare, per valutare la stabilità durante la conservazione, campioni di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, vuoti e

contenenti AF, sono stati conservati per 3 mesi a 0°C. Dopo tale tempo, i sistemi sono stati dispersi in acqua bidistillata e analizzati in termini di dimensioni, PDI e potenziale zeta.

I risultati ottenuti sono perfettamente sovrapponibili a quelli riportati nelle **Tabelle 3.2** e **3.3** (sistemi vuoti e contenenti il farmaco, rispettivamente) dimostrando che entrambi i sistemi micellari sono stabili durante la conservazione nelle condizioni sperimentali impiegate. Inoltre, l'analisi HPLC e UV effettuata sugli stessi campioni ha confermato anche l'integrità del farmaco alle condizioni di conservazione utilizzate.

Inoltre, è stata valutata la stabilità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, vuote e contenenti AF, in un mezzo mimante le condizioni fisiologiche. A tale scopo, i sistemi sono stati analizzati in termini di dimensioni medie, PDI e potenziale zeta prima e dopo incubazione per 24 ore in siero bovino a 37°C e i risultati sono stati riportati in **Tabella 3.4**.

Tabella 3.4: Dimensioni medie, PDI e potenziale zeta delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, vuote e contenenti AF, prima e dopo incubazione in siero fetale bovino per 24 ore a 37°C.

Prima dell'analisi ciascun campione è stato diluito 1:100 v/v con HBS a pH 7.4.

Campione	Dimensioni medie (nm)	PDI	Potenziale Zeta (mV) (\pmSD)
Prima dell'incubazione			
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆	11.98	0.35	-17.22 (\pm 8.26)
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ /AF	12.55	0.31	-19.35 (\pm 4.62)
PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆	12.42	0.32	-15.61 (\pm 5.86)
PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ /AF	15.34	0.31	-18.52 (\pm 3.25)
Dopo incubazione			
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆	35.31	0.51	-13.42 (\pm 4.39)
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -C ₁₆ /AF	31.34	0.65	-13.53 (\pm 6.38)
PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆	36.65	0.26	-12.27(\pm 7.63)
PHEA-PEG ₅₀₀₀ -C ₁₆ /AF	31.30	0.22	-15.92(\pm 4.05)

Come si può notare dai dati riportati, si verifica un incremento delle dimensioni e del PDI di tutti i campioni dopo incubazione, sebbene questi valori siano rimasti nell'ordine di poche decine di nanometri. Tale incremento è giustificabile con una parziale aggregazione di questi sistemi nelle condizioni sperimentali scelte; si evidenzia comunque che anche in tali condizioni le dimensioni delle micelle

polimeriche rimangono abbastanza piccole e tali da non creare complicazioni anche in seguito a somministrazione endovenosa.

Inoltre, il farmaco risulta essere stabile alle condizioni di incubazione, come dimostrato dall'analisi dello spettro UV e del cromatogramma ottenuto dall'analisi HPLC, sovrapponibili con quelli dello standard.

Tali risultati dimostrano che i sistemi ottenuti e l'AF in essi incorporato, oggetto di questa tesi, sono stabili alla conservazione e in condizioni mimanti quelle fisiologiche.

3.5 Saggi biologici in vitro

Al fine di valutare la possibilità di somministrare le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ per diverse vie di somministrazione tra cui la via orale, inalatoria, intratecale ed endovenosa, sono stati condotti su diverse linee cellulari studi di citotossicità in vitro dei copolimeri a differenti concentrazioni.

In particolare, le colture cellulari adoperate sono state la linea cellulare di carcinoma del colon (CaCo-2), la linea cellulare di epitelio bronchiale umano (16-BHE), la linea cellulare di leucemia mieloide

cronica umana (K-562) e la linea di fibroblasti del derma umano (HuDe).

Dispersioni acquose dei copolimeri alle concentrazioni di 5, 0.5 e 0.05 mg/ml sono state tenute a contatto con le cellule per 24 ore, al termine delle quali è stata valutata la vitalità cellulare tramite il saggio MTS.

I risultati, espressi in termini di vitalità cellulare % (rispetto alle cellule non trattate), sono riportati in **Figura 3.7** e **Figura 3.8**.

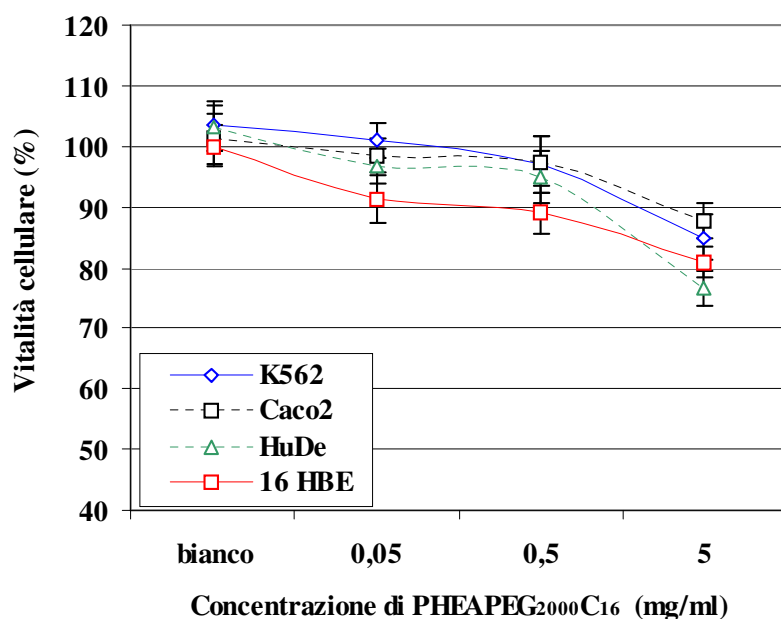


Figura 3.7: Citotossicità dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ incubati per 24 ore con le linee cellulari 16-HBE, Caco-2, HuDe e K-562.

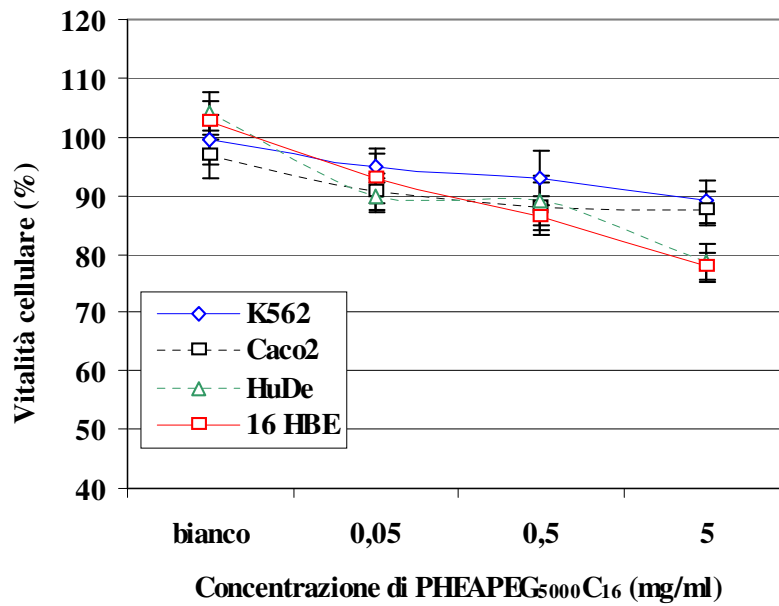


Figura 3.8: Citotossicità dei copolimeri PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ incubati per 24 ore con le linee cellulari 16-HBE, Caco-2, HuDe e K-562.

Come è possibile osservare, i dati ottenuti evidenziano che, per concentrazioni pari a 0.5 e 0.05 mg/ml non si verificano effetti citotossici alle condizioni sperimentali scelte. Infatti, i valori di vitalità cellulare, espressi in percentuale, sono risultati essere maggiori dell'85%. Alla elevata concentrazione polimerica di 5 mg/ml, invece, si è riscontrato qualche effetto sulla vitalità cellulare, che può essere comunque attribuito all'azione tensioattiva dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆.

3.6 Test emolitico

Allo scopo di valutare la possibilità di somministrare per via endovenosa i sistemi micellari ottenuti, ne è stata valutata l'interazione con le membrane degli eritrociti mediante esperimenti di emolisi.

Il rilascio di emoglobina è stato usato per quantificare l'entità del danno subito dagli eritrociti ad opera delle micelle. Gli eritrociti sono stati trattati con Triton X-100 all'1% e PBS a pH 7.4 allo scopo di ottenere rispettivamente i valori corrispondenti al 100% e allo 0% di lisi. Gli eritrociti sono stati inoltre incubati con una dispersione di micelle ad una concentrazione pari a 1.25 mg/ml, per 1 ora.

Sotto tali condizioni, le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, sia vuote che contenenti AF, non hanno mostrato effetti emolitici né alcuna interazione con le membrane dei globuli rossi. Infatti la % di emolisi è sempre stata inferiore al 2.0%, dato paragonabile a quello del bianco. Inoltre, non è stata osservata alcuna aggregazione tra gli eritrociti stessi dopo incubazione con le micelle.

Quindi, l'assenza di attività litica e l'assenza di aggregazione degli eritrociti suggeriscono una ottima biocompatibilità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, vuote e piene, e ne

supportano il loro potenziale impiego come carrier di farmaci anche per una somministrazione endovenosa *in vivo*.

3.7 Preparazione di micelle contenenti Rodamina B base

Allo scopo di valutare la capacità delle micelle PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ di permanere nel circolo sanguigno e di sfuggire al processo di fagocitosi, è stato effettuato un test di uptake in vitro utilizzando macrofagi murini J774 A.1.

A tale scopo, all'interno delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è stata incorporata la Rodamina B base, molecola fluorescente.

Le cellule J774 A.1 sono state fatte crescere in un mezzo contenente 0.2 mg/ml di Rodamina B base, libera o incorporata all'interno delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, per 4 e 8 ore (**Figura 3.9**).

Come si evince dalle immagini a e b, in presenza di Rodamina B base libera, le cellule appaiono fortemente e omogeneamente fluorescenti a causa della diffusione della Rodamina B libera al loro interno

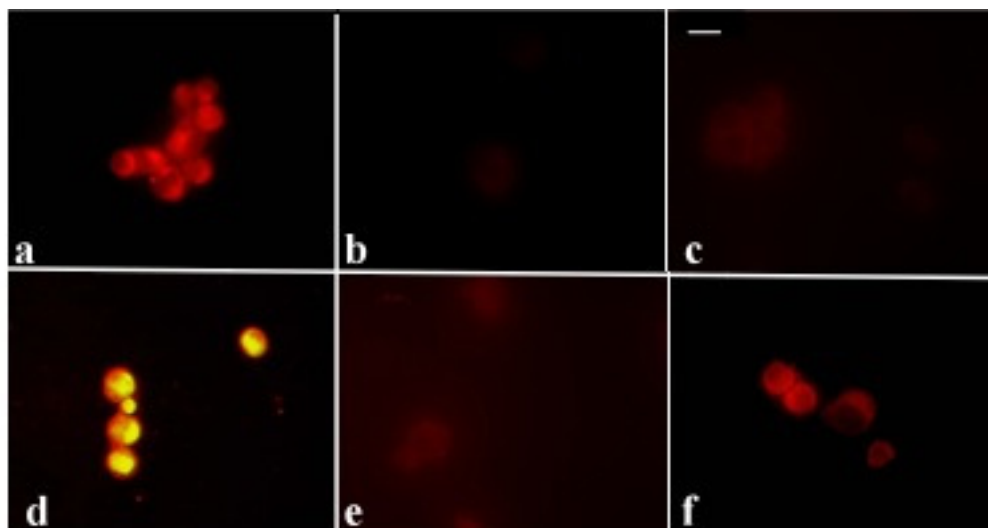


Figura 3.9: Immagini di fluorescenza di cellule J774 A.1 dopo 4 (a,b,c) e 8 (d,e,f) ore di incubazione, rispettivamente, in presenza di Rodamina B base (a e d), micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ contenenti Rodamina B base (b ed e) e micelle di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti Rodamina B base (c ed f).

La barra rappresenta 20 nm.

Al contrario in presenza di micelle le cellule evidenziano un comportamento diverso a seconda del sistema considerato e comunque tempo dipendente. Infatti dopo 4 ore di incubazione, come mostrato nelle immagini b e c (**Figura 3.9**), le cellule J774 A.1 internalizzano piccole quantità sia di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ che di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆.

Mentre, paragonando le cellule incubate per 8 ore con le micelle contenenti Rodamina, si nota al loro interno un minore contenuto di micelle di PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ fluorescenti (immagine e) rispetto alle

micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ (immagine f), suggerendo una migliore capacità delle prime di sfuggire al processo di fagocitosi.

Tale risultato potrebbe essere spiegato considerando le differenze superficiali, dovute al PEG, dei sistemi presi in considerazione ovvero la presenza in tali micelle di catene di PEG a più elevato peso molecolare e in grado pertanto di creare una *shell* idrofila più ampia e più efficiente nel conferire proprietà *stealth* al sistema.

Tenuto conto di tali risultati e della ottima biocompatibilità dei sistemi ottenuti, nonché delle capacità di rilasciare in maniera prolungata nel tempo l'AF in essi incorporato, le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ rappresentano degli ottimi vettori per la veicolazione di tale molecola e di altri farmaci con analoghe proprietà chimico-fisiche e biofarmaceutiche.

4. CONCLUSIONI (I PARTE)

Negli ultimi anni la ricerca farmaceutica, grazie ai recenti sviluppi tecnologici, ha mostrato notevole interesse verso l'utilizzo di materiali polimerici come *carrier* di farmaci, in grado di migliorare in vario modo la biodisponibilità dei farmaci. Tra tali *carrier* le micelle polimeriche presentano grandi potenzialità perché possono essere realizzate con tensioattivi polimerici (unimeri) progettati e costruiti in modo tale da soddisfare requisiti ben precisi.

Nel presente lavoro di tesi di dottorato, sono stati sintetizzati e caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico e biologico i copolimeri anfifilici PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, al fine di proporre un possibile utilizzo come carrier polimerici per l'AF.

L'inserimento nella struttura del PHEA di catene di PEG ed esadecilamina consente di ottenere copolimeri PHEA-PEG-C₁₆ in grado di auto-assemblarsi e formare sistemi colloidali di tipo micellare dotati di un "*core*" idrofobico e una "*shell*" idrofila, come dimostrato

da misure di fluorescenza in presenza di pirene, che hanno permesso di determinare la CAC.

I sistemi micellari di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, sia vuoti che contenenti AF, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico in termini di dimensioni medie, PDI e potenziale zeta.

Particolare attenzione è stata posta sulle micelle in cui è stato incorporato con successo AF, sulle quali sono stati condotti anche studi di rilascio in PBS e in plasma umano, studi di stabilità in diverse condizioni.

Le micelle vuote sono state inoltre caratterizzate ampiamente dal punto di vista biologico mediante test di citotossicità e di emolisi.

I risultati di tali studi hanno permesso di dimostrare che entrambi i sistemi micellari sono biocompatibili, rilasciano lentamente il farmaco, sono stabili e presentano, soprattutto quelle contenenti catene di PEG₅₀₀₀, quelle proprietà *stealth* che consentirebbero loro di permanere per un lungo tempo nel circolo, sfuggendo dalla cattura del RES.

Concludendo, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi incoraggiano l'impiego delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ come possibile “*colloidal drug delivery systems*” per l'AF.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE (II PARTE)

5.1 Sintesi del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

Durante il mio triennio di Dottorato mi sono occupato della sintesi e caratterizzazione di un nuovo copolimero *graft* anfifilico ottenuta da un fosfolipide peghilato e una poliaspartammide.

In particolare, il derivato fosfolipidico scelto, l'1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Amino(PolietilenGlicole)₂₀₀₀]

(DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂) è stato chimicamente legato ai gruppi idrossilici presenti in catena laterale dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartamide (PHEA) al fine di ottenere il copolimero *graft* che in sigla è stato indicato come PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE. Il prodotto ottenuto è un derivato polimerico con elevata versatilità grazie alla possibilità di ulteriore funzionalizzazione e alla presenza della porzione peghilata. Inoltre, l'introduzione di ciascuna molecola di fosfolipide sul PHEA permette l'inserimento di due catene stearoiliche che possono contribuire nell'insieme alla formazione di micelle molto stabili attraverso l'aumento del numero di interazioni idrofobiche.

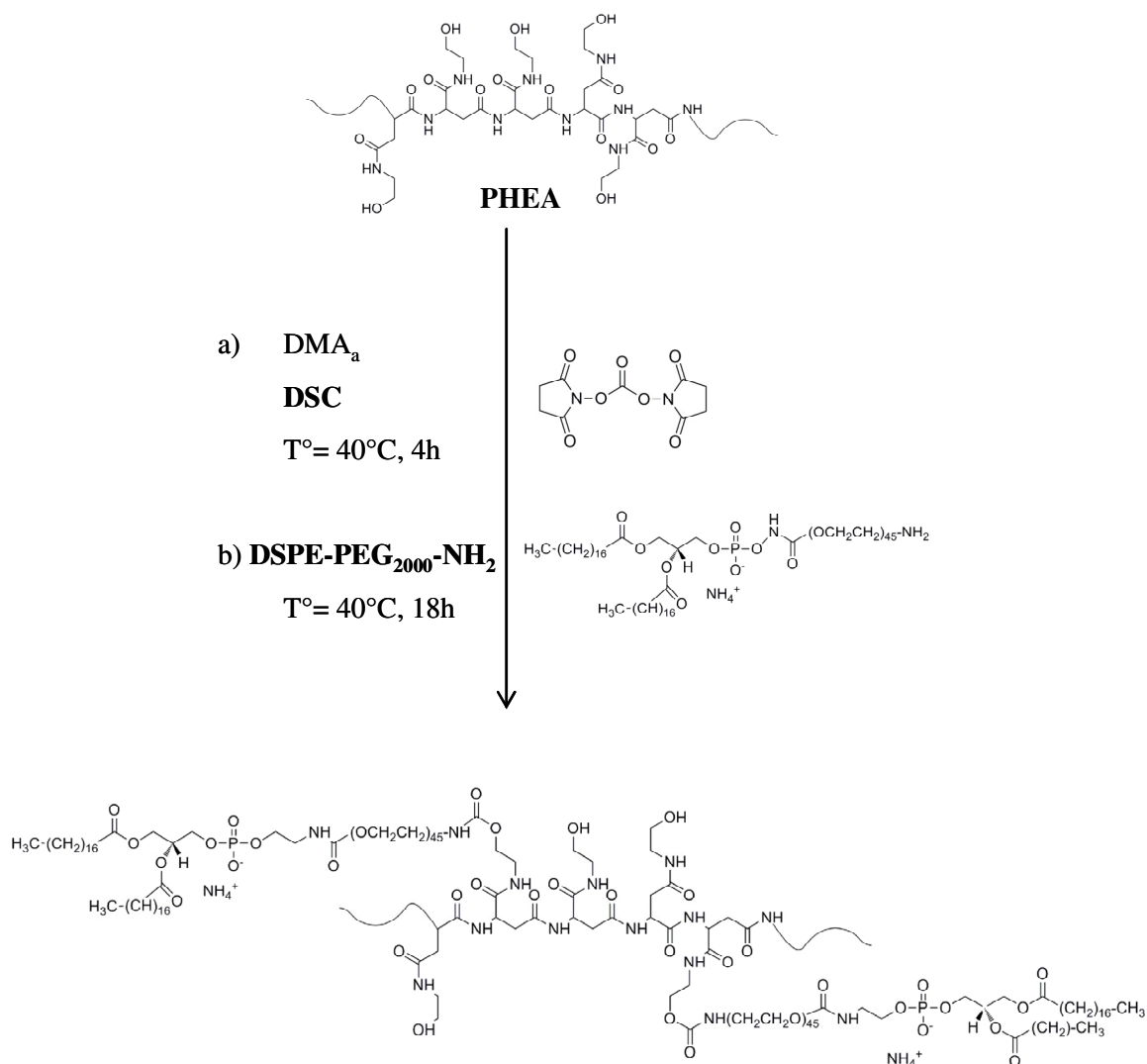
La reazione di derivatizzazione del PHEA con il DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ è stata condotta in un solvente organico in un singolo step di sintesi, che prevede l'iniziale attivazione dei gruppi idrossilici del PHEA mediante il N,N'-Disuccinimidil carbonato (DSC) per 4 h a 40°C seguita dalla reazione di coniugazione con il DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ per 18 h a 25°C (vedi parte sperimentale). La quantità di DSC e di DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ è stata determinata secondo i rapporti $R_1=0.08$ e $R_2=0.025$, dove

$$R_1 = \frac{\text{moli di DSC}}{\text{moli di gruppi idrossilici del PHEA}}$$

ed

$$R_2 = \frac{\text{moli di DSPE-PEG}_{2000}\text{-NH}_2}{\text{moli di gruppi idrossilici del PHEA}}$$

La procedura sintetica e la struttura chimica del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE ottenuto sono riportate nello **Schema 5.1**.



Il prodotto ottenuto è risultato insolubile in diclorometano e acetone, ma solubile in dimetilsolfossido e N,N'-dimetilformamide e facilmente disperdibile in acqua.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE è riportato in **Figura 5.1**.

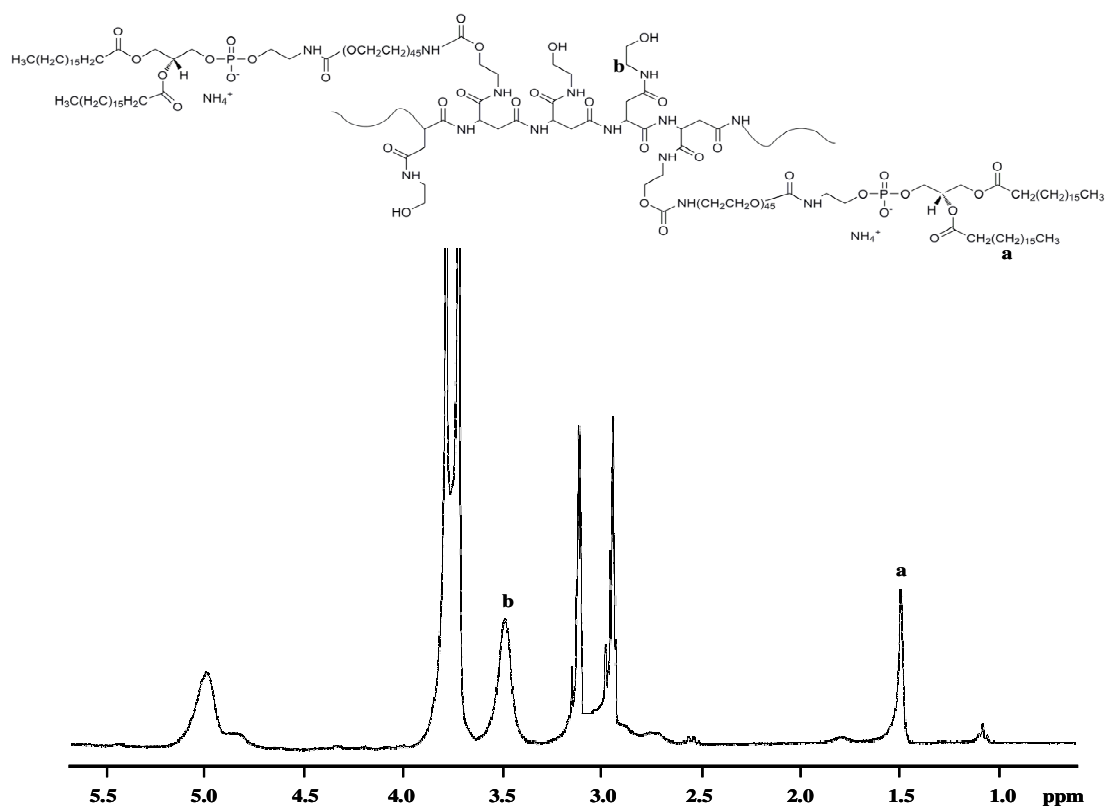


Figura 5.1: Spettro ^1H -NMR del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE in DMF- d_7 .

Il grado di derivatizzazione in porzioni di -PEG₂₀₀₀-DSPE ($\text{DD}_{\text{DSPE-PEG}}$) per il copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE è stato calcolato confrontando gli integrali dei picchi relativi ai protoni a δ 1.48 attribuibili a $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2-$ e appartenenti ai residui -PEG₂₀₀₀-DSPE (segnale **a** dello spettro ^1H -NMR riportato in Fig. 5.1) con gli integrali relativi ai protoni a δ 3.48 attribuibili a -

NHCH₂CH₂O- appartenenti al PHEA (segnale **b** dello spettro ¹H-NMR riportato in Fig. 5.1). Il DD_{DSPE-PEG} è stato espresso come valore medio di tre determinazioni ed è risultato pari a 1.5 ± 0.3 mol %.

Al fine di verificare l'avvenuta reazione di derivatizzazione del PHEA con il DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂, sono stati valutati il peso molecolare medio pesato (\overline{M}_w) e l'indice di polidispersità

($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) sia del PHEA che del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE mediante Cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) (vedi parte sperimentale). È stato trovato che il \overline{M}_w del PHEA era pari a 41.4 kDa ($\overline{M}_w/\overline{M}_n=1.8$) mentre per il copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE è stato trovato un valore uguale a 61.0 kDa ($\overline{M}_w/\overline{M}_n=1.9$). Quest'ultimo è in accordo con quello teorico calcolato considerando il \overline{M}_w del PHEA ed il valore del DD_{DSPE-PEG} trovato, dimostrando di fatto che non si verificano fenomeni di degradazione a carico del backbone del PHEA alle condizioni operative scelte per ottenere il copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE. Un'ulteriore conferma dell'avvenuta reazione, si ottiene dallo spettro FT-IR del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, riportato in **Figura 5.2**.

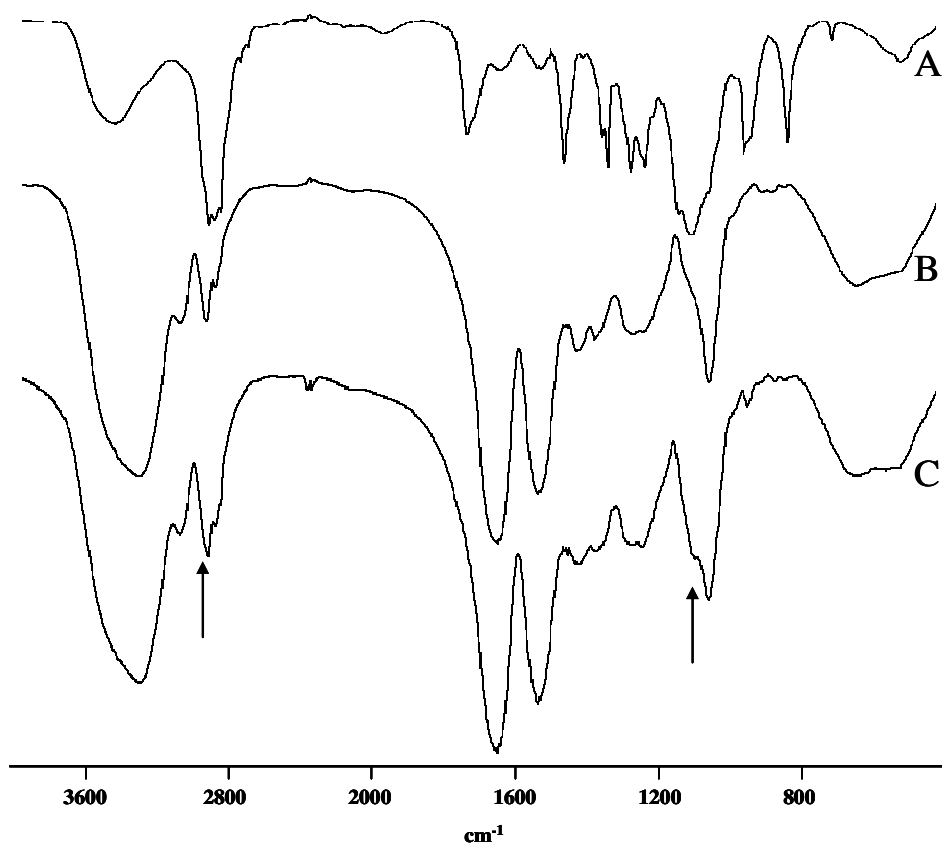


Figura 5.2: Spettro FT-IR di DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ (A), PHEA (B) e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE (C).

Gli spettri sono stati registrati in scala di trasmittanza (%T).

Infatti, lo spettro del PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE (**Figura 5.2 C**) mostra i tipici picchi del DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂, come il picco a 1108 cm⁻¹ attribuibile allo *stretching* C-O delle porzioni del PEG. Inoltre, si può osservare un incremento di intensità del picco a 2920 cm⁻¹,

grazie al contributo dello *stretching* asimmetrico dei $\text{-CH}_2\text{-}$ del DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂.

5.2 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

Una volta effettuata l'opportuna caratterizzazione del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE e considerate le sue potenziali proprietà anfifiliche, è stata valutata la sua tendenza all'auto-aggregazione in dispersione acquosa.

Il legame al backbone del PHEA di porzioni idrofile (quali sono le catene di PEG) e idrofobiche (quali i residui stearoilici), potenzialmente promuove, in fase acquosa, l'aggregazione del copolimero a formare strutture micellari grazie alla presenza di multipli siti di interazione idrofobica [*Cavallaro et al. 2004; Lukyanov and Torchilin, 2004*], in cui i residui stearoilici costituiscono il *core* idrofobico mentre le catene del PEG sono esposte nella fase acquosa esterna formando una *shell* idrofila (insieme al PHEA). Tale *shell* conferisce alla micella proprietà *stealth*.

Per valutare il verificarsi della formazione di strutture micellari, è stata determinata la concentrazione di aggregazione critica (CAC) in acqua del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE tramite studi di fluorescenza, usando il pirene come probe fluorescente [Rosen, 1989]. In presenza di micelle, il pirene si ripartisce preferenzialmente entro il *core* idrofobico cambiando le sue proprietà di fluorescenza e dunque il suo spettro di fluorescenza [Gao *et al.*, 2008]. La CAC si ottiene rilevando i rapporti I_{337}/I_{333} dagli spettri di eccitazione del pirene contro il logaritmo della concentrazione acquosa del copolimero in fase acquosa [Francis *et al.*, 2004]. In **Figura 5.3** è mostrato il grafico che riporta il valore di I_{337}/I_{333} contro il log C (g·l⁻¹) del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE.

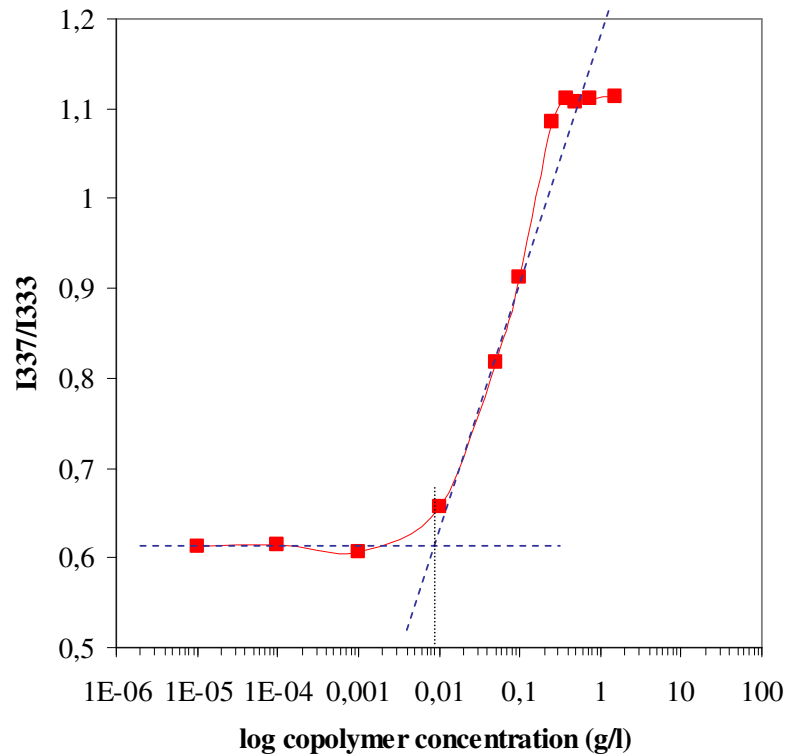


Figura 5.3: Intensità del rapporto I_{337}/I_{333} (determinati dallo spettro di eccitazione del pirene) in funzione del logaritmo della concentrazione acquosa del copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE ($1.5 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) per $\lambda_{\text{em}}=390 \text{ nm}$. Ciascun valore è ottenuto dalla media di tre esperimenti indipendenti.

Come è possibile vedere, al di sotto di una certa concentrazione acquosa del copolimero, il rapporto I_{337}/I_{333} rimane costante, ma con l'incremento della concentrazione del copolimero, questo rapporto aumenta significativamente al di sopra di un certo valore fino a raggiungere un *plateau*. Tale valore indica l'inizio del processo di auto-aggregazione. I valori della CAC sono stati determinati intersecando le due rette ottenute linearizzando i due

differenti rami della curva [Gao *et al.*, 2008]. È stato determinato graficamente per il copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE un valore di CAC pari a $7.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (corrispondente a $1.23 \times 10^{-7} \text{ M}$). Tale valore risulta essere da 1000-volte a 100-volte più piccolo, rispettivamente, dei valori ottenuti mediamente da tensioattivi convenzionali e del PEG-PEA [Lukyanov and Torchilin, 2004]. Il valore di CAC trovato indica che le micelle preparate dal copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE saranno stabili in mezzi acquosi e manterranno la loro integrità anche a seguito di grandi diluizioni, per esempio, in fluidi biologici (come il muco) in una eventuale applicazione terapeutica polmonare.

Una possibile rappresentazione schematica della formazione della struttura *core-shell* a partire dal copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE in dispersione acquosa è mostrato in **Figura 5.4**.

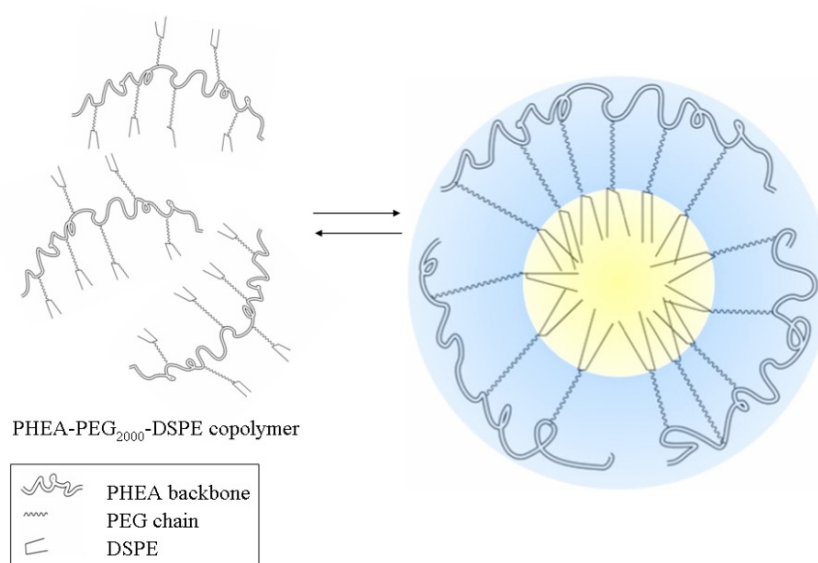


Figura 5.4: Rappresentazione schematica della formazione della struttura *core-shell* a partire dal copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

in dispersione acquosa.

Per confermare la formazione di strutture colloidali in mezzi acquosi, gli aggregati micellari sono stati inoltre caratterizzati in termini di dimensioni medie, indice di polidispersità (PDI), in tre differenti mezzi acquosi utilizzando la spettroscopia a correlazione fotonica (PCS), e i dati analitici ottenuti sono riportati in **Tabella 5.1**.

Tabella 5.1: Valori di dimensioni medie, PDI e potenziale zeta in

acqua bidistillata, PBS e NaCl 0.9 p/p % delle micelle di
PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE vuote.

Micelle	Mezzo di dispersione	Dimensioni medie (nm)	PDI	Potenziale Zeta (mV)(±S.D.)
Vuote	H ₂ O	26.4	0.3	-19.0 (±6.8)
	PBS	31.8	0.4	-7.7 (±2.0)
	NaCl 0.9%	28.7	0.3	-5.7 (±1.1)

Dai valori ottenuti si evince che tali nanostrutture hanno una distribuzione dimensionale stretta con un diametro medio di circa 26 nm in acqua bi-distillata, e leggermente più grande negli altri mezzi di indagine. Inoltre, il valore di potenziale zeta di tali strutture, riportato in **Tabella 5.1**, è circa -19.0 mV in acqua bi-distillata ed aumenta quando è determinato in soluzioni acquose di PBS ed NaCl, per l'effetto schermante degli ioni in soluzione.

5.3 Preparazione e caratterizzazione di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE contenenti Beclometasone dipropionato.

Al fine di valutare la possibilità di usare questi *carrier* per il rilascio modificato di agenti terapeutici scarsamente solubili in acqua, è stato scelto il Beclometasone dipropionato (BDP) come farmaco modello [Wilcox and Avery, 1973; Umland et al., 2002]. Il BDP, un glucocorticoide insolubile in acqua, viene spesso somministrato nel tratto respiratorio sotto forma di sospensione mediante un nebulizzatore. In questa applicazione pertanto le strutture micellari possono rappresentare un appropriato sistema di veicolazione sia per la possibilità che offrono di aumentare la solubilità del BDP e di dare un rilascio sostenuto a livello polmonare, sia per la possibilità che esse hanno di internalizzazione più efficiente nell'epitelio polmonare, considerando la capacità dei sistemi nanostrutturati di penetrare dentro le cellule, ad esempio mediante un meccanismo di endocitosi.

Al fine di incapsulare il BDP entro le micelle, è stato scelto un semplice metodo già riportato in letteratura [Cavallaro et al., 2003; Craparo et al., 2008]. Brevemente, questa tecnica si realizza mediante semplice dispersione del copolimero e del farmaco entrambi allo stato solido in un solvente organico volatile usando pestello e mortaio; il solvente organico è poi evaporato

fino a formare un sottile strato (film) della miscela di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE/BDP. La fase successiva consiste nell'idratazione del film con acqua bidistillata e successiva rimozione della quantità di farmaco in eccesso rispetto alla capacità di solubilizzazione delle micelle, attraverso centrifugazione e filtrazione.

Per quantificare il BDP intrappolato nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, è stata effettuata una analisi HPLC, come riportato nella parte sperimentale. La *drug loading* (DL%), espressa come rapporto percentuale in peso tra il farmaco caricato e il sistema secco (micelle + BDP), è risultato essere 3.0 p/p %.

Al fine di valutare di quanto viene aumentata la solubilità del BDP in presenza delle micelle polimeriche, sono stati realizzati degli studi di solubilità del BDP libero ed incapsulato dentro le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE. Nelle condizioni sperimentali utilizzate, è stato osservato un incremento di solubilità del farmaco incapsulato di 240 volte rispetto al farmaco libero. In particolare, il valore della solubilità cresce da 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1.2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Così come per le micelle vuote, le micelle contenenti BDP sono state caratterizzate in termini di dimensioni medie e PDI, e i risultati sono stati riportati in **Tabella 5.2**.

Tabella 5.2: Valori di dimensioni medie, PDI e potenziale zeta in acqua bidistillata, PBS e NaCl 0.9 p/p % delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE contenenti BDP.

Micelle	Mezzo di dispersione	Dimensioni medie (nm)	PDI	Potenziale Zeta (mV)(\pm S.D.)
Contenenti BDP	H ₂ O	69.2	0.4	-12.3 (\pm 3.1)
	PBS	58.6	0.4	-2.5 (\pm 1.8)
	NaCl 0.9%	66.4	0.4	-3.5 (\pm 2.4)

Come è possibile vedere, si verifica un incremento di dimensioni medie delle micelle cariche di farmaco rispetto alle micelle vuote, probabilmente per la presenza del farmaco nel *core* micellare; le dimensioni comunque si mantengono sempre abbastanza piccole (inferiori agli 80 nm) da consentire per tali sistemi una somministrazione polmonare. Inoltre la presenza del farmaco

influenza anche i valori di potenziale zeta, che nel caso di sistemi pieni subiscono un leggero decremento in valore assoluto in tutti i mezzi di indagine.

Al fine di confermare le dimensioni nanometriche e valutare la morfologia delle micelle è stata usata la tecnica della microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FE-SEM). Le immagini ottenute per le micelle vuote sono riportate in **Figura 5.5**.

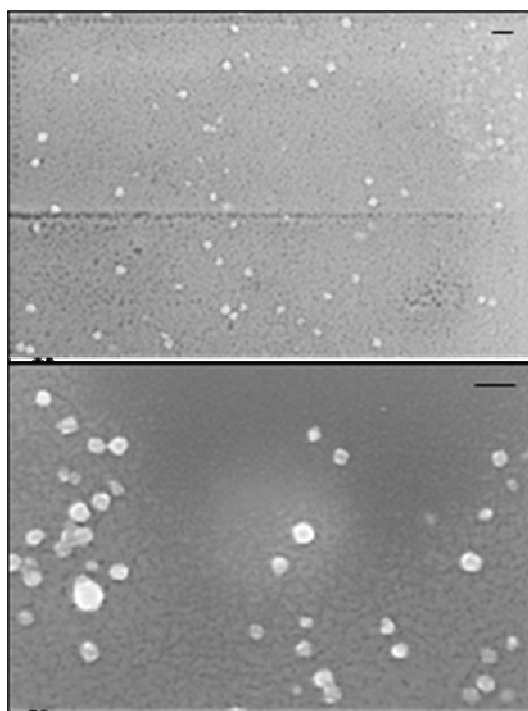


Figura 5.5: Immagini FE-SEM delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE.

La barra rappresenta 100 nm.

Tali immagini sono in accordo con i dati ottenuti dall'analisi dimensionale e rilevano la forma sferica dei campioni. Le stesse considerazioni possono essere fatte per le micelle contenenti BDP.

Per supportare le loro potenzialità come DDS, la stabilità alla conservazione delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE vuote e piene, è stata valutata considerando dimensioni, PDI e potenziale zeta dei sistemi, seguendo una procedura riportata in letteratura [Gaber *et al.*, 2006].

Infatti sia le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE vuote che contenenti farmaco sono state poste per tre mesi a 0°C sotto atmosfera di argon. Dopo tale tempo, le micelle sono state disperse in acqua bidistillata e analizzate in termini di dimensioni, PDI e potenziale zeta. I risultati ottenuti suggeriscono che sia le micelle vuote che le piene sono stabili durante la conservazione alle condizioni sperimentali scelte, e ciò è dimostrato dal fatto che i valori di dimensioni, PDI e potenziale zeta sono sovrapponibili a quelli riportati in **Tabella 5.1** e **5.2**.

Al fine di valutare la capacità di tali micelle di trattenere nel *core* il farmaco incapsulato e di rilasciarlo in maniera prolungata nel tempo nei mezzi fisiologici, è stato realizzato uno studio di rilascio

in tampone fosfato (PBS) a pH 7.4 in miscela con etanolo (80:20), valutando la quantità di farmaco rilasciata dalle micelle ad intervalli di tempo predefiniti attraverso un tubo da dialisi. L'uso di tale mezzo di dissoluzione per valutare preparazioni contenenti principi attivi idrofobi è in accordo con quanto riportato dalla Farmacopea Europea [*Pitarresi et al.*, 2007; *Helle et al.*, 2010]. Inoltre, è stato valutato il profilo di dissoluzione del BDP da solo nelle stesse condizioni usate per effettuare gli studi di rilascio. La quantità di BDP rilasciata è stata espressa come rapporto percentuale tra il peso del farmaco rilasciato a tempi prefissati e l'ammontare totale di BDP caricato nelle micelle. Nella **Figura 5.6**, la dissoluzione del farmaco e il profilo di rilascio dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE sono stati riportati fino a 48 h di incubazione.

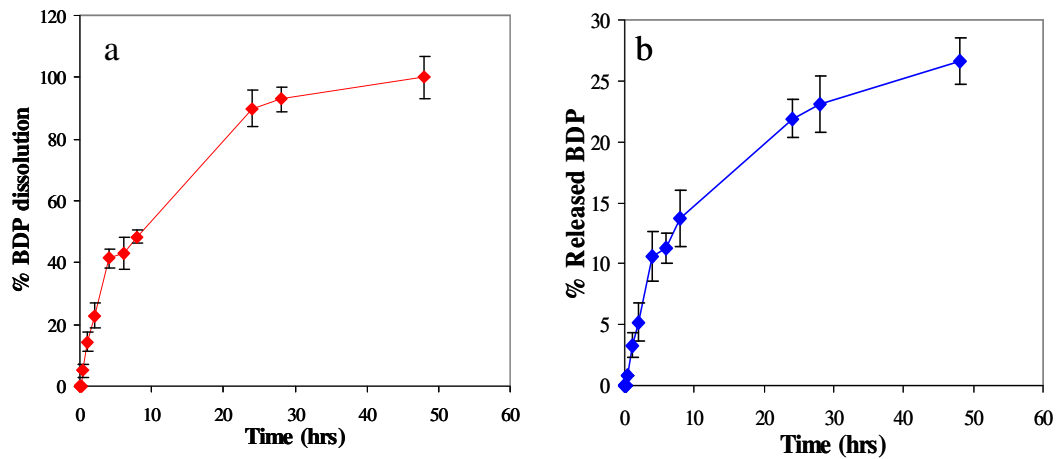


Figura 5.6: (a) Profilo di rilascio del BDP da micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE e (b) dissoluzione del BDP in miscela PBS (pH 7.4) etanolo (80:20, v/v). I dati rappresentano la media \pm S.D (n=3).

I risultati mostrati in **Figura 5.6** indicano chiaramente che tali micelle sono in grado di trattenere più del 70% dell'iniziale quantità di farmaco intrappolata nel *core* anche dopo 48 h di incubazione, indicando una elevata stabilità di tali strutture in mezzi fisiologici.

5.4 Saggi biologici in vitro

Prendendo in considerazione la possibilità di somministrare le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE contenenti BDP in forma di aerosol per via polmonare, sono stati condotti studi di citotossicità usando una linea di cellule epiteliali bronchiali umane (16HBE) come modello di cellule epiteliali.

Questo studio è basato sulla possibilità di massimizzare gli effetti locali al polmone e di minimizzare gli effetti sistemici derivanti da altre vie di somministrazione, nonché sulle capacità di ridurre sia la frequenza delle applicazioni che la tosse lieve e la dispnea causata dall'irritazione che il farmaco somministrato localmente in forma libera causa usando le altre forme di dosaggio inalatorie ad oggi disponibili.

La citotossicità delle micelle cariche di BDP è stata valutata attraverso il saggio MTS a differenti concentrazioni di farmaco (*range* $7 \cdot 10^{-4}$ - $7 \cdot 10^{-7}$ M), dopo 24 e 48 h di incubazione. Inoltre, la vitalità cellulare è stata valutata in presenza delle micelle vuote, a concentrazioni polimeriche uguali a quelle usate nei campioni contenenti le micelle cariche di farmaco. I risultati sono riportati in **Figura 5.7.**

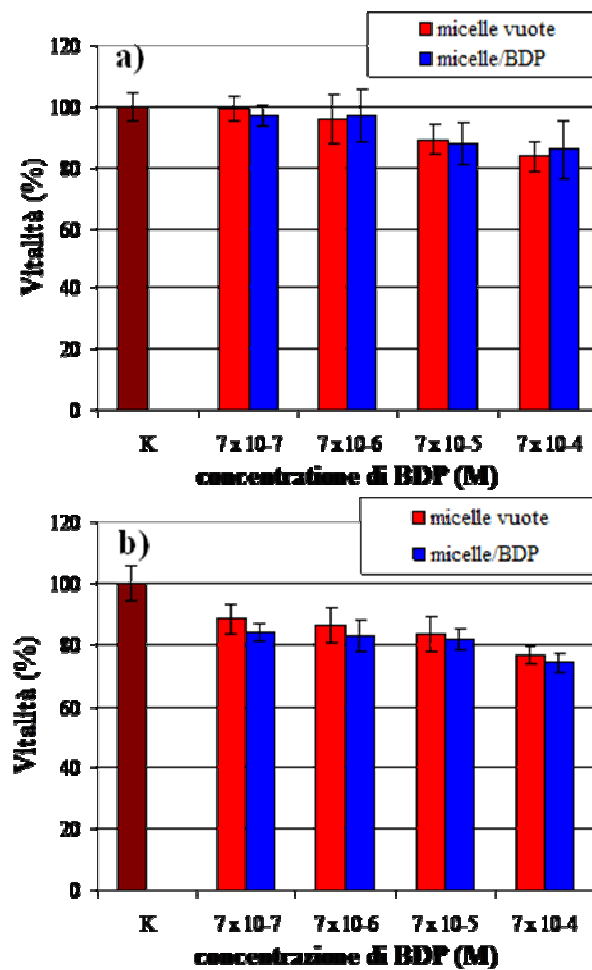


Figura 5.7: Vitalità delle cellule 16HBE dopo incubazione con le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE sia vuote che piene alle diverse concentrazioni di farmaco (*range* $7 \cdot 10^{-4}$ - $7 \cdot 10^{-7}$ M) dopo 24 h (a) e 48 h (b) di incubazione.

La vitalità è stata determinata attraverso il saggio colorimetrico MTS e i valori di deviazione standard (\pm SD) sono stati calcolati sulla base di

tre esperimenti condotti in triplicato.

Come possiamo vedere, sia le micelle vuote che piene mostrano una bassa tossicità per valori di concentrazione compresi tra $7 \cdot 10^{-5}$ e $7 \cdot 10^{-7}$ M, dopo 24 e 48 h di incubazione. Alla più alta concentrazione di farmaco testata ($7 \cdot 10^{-4}$ M), tali valori scendono

sotto l'80% dopo 48 h di incubazione; questo è dovuto molto probabilmente alla elevata concentrazione di copolimero usata per solubilizzare il farmaco, come confermato dal fatto che tale valore di vitalità cellulare decresce anche in presenza delle micelle vuote.

L'eccellente biocompatibilità di questi sistemi è stata confermata dal test di emocompatibilità. Il rilascio di emoglobina da eritrociti è usato per quantificare il danneggiamento della membrana causato dalle micelle. Sono state usate una soluzione all'1% di Triton X-100 e una di PBS a pH 7.4 per trattare gli eritrociti in modo da ottenere il 100 % e lo 0 % della lisi, rispettivamente. Gli eritrociti sono stati incubati con una dispersione acquosa delle micelle, sia vuote che piene, ad una concentrazione finale di copolimero uguale a 0.5, 0.05 e 0.005 mg·mL⁻¹ per 1 h. In queste condizioni, non si è ottenuto alcun effetto emolitico, indicando che non ci sono significative interazioni delle micelle con la membrana dei globuli rossi. La percentuale di emolisi (risultati non mostrati) si mantiene infatti sempre al di sotto del 2.4%, dati sovrapponibili con quelli del bianco. Inoltre, non è stata osservata nessuna aggregazione degli eritrociti al microscopio ottico dopo incubazione con le micelle (dati non riportati). Quindi, l'assenza di attività litica e l'assenza di aggregazione degli eritrociti conferma

ulteriormente la biocompatibilità sia delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE vuote che contenenti BDP.

Infine, al fine di valutare l'effettiva quantità di farmaco che penetra dentro le cellule grazie all'incorporazione in strutture micellari, è stato condotto un esperimento di *uptake* su cellule 16HBE. Per questo esperimento, è stato scelto un tempo massimo di incubazione di 48 h e una concentrazione di $7 \cdot 10^{-5}$ M. Per un confronto, l'*uptake* del farmaco libero da parte delle cellule è stata valutata utilizzando una sospensione del farmaco alla stessa concentrazione, come riportato da altri autori [Gaber *et al.*, 2006].

La **Figura 5.8** mostra la quantità di BDP internalizzata, determinata mediante analisi HPLC del lisato delle 16HBE dopo diversi tempi di incubazione (3, 6, 12, 24, 36 e 48 h) in presenza di BDP, libero o caricato nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE.

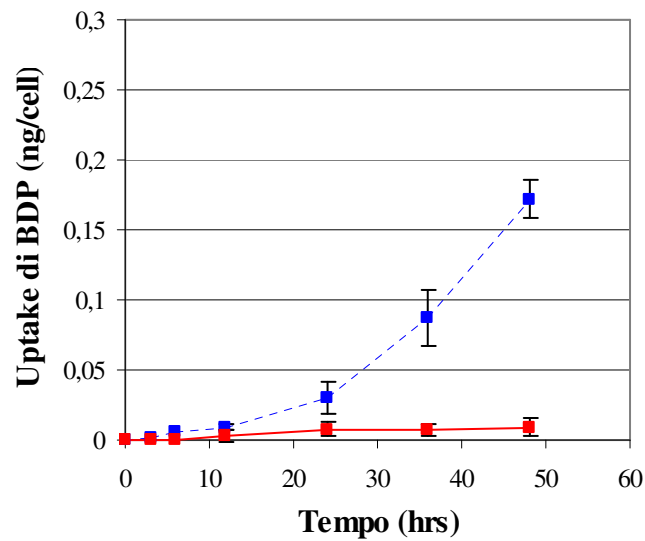


Figura 5.8: Quantità di BDP trovata nel lisato delle cellule 16HBE in funzione del tempo di incubazione, dopo incubazione in presenza di BDP in forma libera (curva rossa) o incorporato in micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE (curva blu).

Come può essere chiaramente dedotto, nelle cellule è stata trovata una elevata quantità di farmaco dopo 48 h di incubazione in presenza di micelle. Al contrario, quando si è utilizzata la sospensione di BDP, tale quantità, è molto bassa. Comunque, deve essere sottolineato che dopo 48 h di incubazione con la sospensione di farmaco, la vitalità delle cellule risulta essere pari al 52 %.

Questi risultati suggeriscono che il marcato *uptake* cellulare di farmaco dipende dalla incorporazione dello stesso all'interno delle

micelle. Tale fenomeno, probabilmente dovuto ad un processo di endocitosi, potrebbe essere sfruttato per il trattamento dell'infiammazione tissutale e dell'asma, in quanto massimizza l'effetto terapeutico e riduce la dose di farmaco da somministrare, oltre a ridurre potenzialmente gli effetti tossici o collaterali dovuti all'assorbimento sistemico del farmaco.

Inoltre, la presenza di un elevato livello di fosfolipasi umana A2 nei siti infiammatori, capace di degradare i residui fosfatidil-etanolamina peghilati, potrebbe aumentare il rilascio del farmaco dal *core* micellare a livello polmonare dopo internalizzazione [Davidsen, 2001; Vermehren et al., 2001; Gaber et al., 2006].

6. CONCLUSIONI (II PARTE)

Concludendo, in questa seconda parte del lavoro di dottorato è stata descritta la sintesi di un nuovo copolimero *graft* anfifilico, a partire da un fosfolipide peghilato e una poliaspartamide, attraverso un legame covalente ottenuto grazie all'uso del DSC. Il copolimero ottenuto, in sigla PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, è stato opportunamente caratterizzato per confermare la struttura anfifilica, dovuta alla porzione idrofila costituita sia dal PHEA che dal PEG, e alle code stearoiliche idrofobiche del fosfolipide utilizzato; tale copolimero anfifilico ha la capacità di autoaggregarsi a formare micelle in acqua con un valore di CAC nell'ordine di 10^{-7} M.

È stato dimostrato che le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE sono capaci di incapsulare farmaci lipofili, come il BDP, e che la solubilità del farmaco modello scelto in forma micellare è incrementata di circa 240 volte. Sia le micelle vuote che quelle piene mostrano un potenziale zeta negativo, un diametro medio nell'ordine di poche decine di nanometri, con piccole differenze dovute alla presenza del farmaco nel

core, ma in ogni caso con valori di dimensione media al di sotto gli 80 nm.

Le dimensioni nanometriche, sia delle micelle vuote che delle micelle piene, sono state confermate da analisi FE-SEM, la quale ha dato informazioni sulla morfologia sferica di tali micelle. Mediante gli studi di rilascio del farmaco è stato dimostrato che dopo le 48 ore, le micelle sono in grado di trattenere più del 70 % del farmaco intrappolato inizialmente, il che dà informazioni sulla elevata stabilità di tali micelle nei mezzi fisiologici. Inoltre, è stata mostrata una eccellente stabilità durante conservazione come polvere liofilizzata a 0°C.

Gli studi in vitro su cellule epiteliali bronchiali umane (16 HBE) rivelano l'eccellente biocompatibilità, sia delle micelle vuote che delle micelle cariche di farmaco; inoltre, è stata dimostrata la capacità di internalizzazione di elevate quantità di BDP da parte delle stesse cellule dovuta all'incapsulazione del farmaco nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, rispetto al farmaco in sospensione.

I risultati ottenuti incoraggiano l'uso di questi sistemi nel trattamento delle malattie polmonari mediante la somministrazione topica, ad esempio in forma di dispersione colloidale, grazie alla capacità delle

micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE di solubilizzare una elevata quantità di BDP e di penetrare nelle cellule epiteliali del polmone.

In particolare, può essere proposta un'interessante applicazione nell'aerosolterapia per la somministrazione del BDP in sostituzione alla convenzionale sospensione del farmaco.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE (III PARTE)

7.1 Sintesi dei copolimeri PHEA-PLA e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA

Durante il corso di Dottorato mi sono occupato infine della sintesi di due copolimeri anfifilici del PHEA, il PHEA-PLA e il PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA, da cui sono state ottenute con successo delle nanoparticelle polimeriche potenzialmente utilizzabili quali sistemi per il rilascio modificato di farmaci.

Al fine di consentire il *grafting* del PLA al PHEA, i gruppi carbossilici del PLA sono stati attivati usando CDI come agente attivante dei gruppi carbossilici, per ottenere il derivato carbonilimidazolico del PLA attivato (indicato con aPLA); successivamente il aPLA è stato posto a reagire con i gruppi idrossilici del PHEA per ottenere il copolimero voluto (PHEA-PLA).

In particolare, la sintesi dei copolimeri PHEA-PLA con diverso grado di derivatizzazione, è stata condotta attivando il PLA con CDI in solvente organico a 40°C per 4 ore; la miscela di reazione è stata quindi posta a reagire con il PHEA per 72 ore, in ambiente organico a 40°C (vedi parte sperimentale).

Le quantità di PLA e CDI utilizzate per ottenere i copolimeri PHEA-PLA a diverso grado di derivatizzazione sono state calcolate considerando $R_1=1.2$ ed $R_2= 0.05, 0.07$ e 0.1 essendo

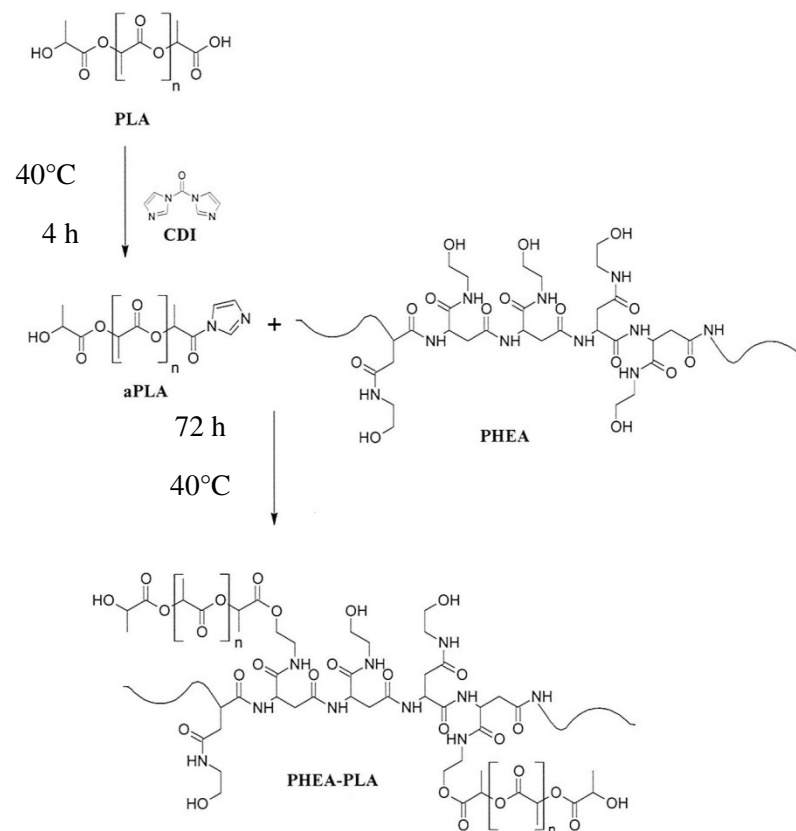
$$R_1 = \frac{\text{moli di CDI}}{\text{moli di PLA}}$$

ed

$$R_2 = \frac{\text{moli di PLA}}{\text{moli di gruppi idrossilici liberi del PHEA}}$$

I copolimeri di PHEA-PLA preparati con R_2 pari a 0.05, 0.07 e 0.01 sono indicati in questo lavoro di tesi rispettivamente come PHEA-PLA_(A), PHEA-PLA_(B) e PHEA-PLA_(C).

La procedura di sintesi del PHEA-PLA è descritta nello **Schema 7.1**, mentre il suo spettro $^1\text{H-NMR}$, effettuato in DMSO deuterato, è riportato nella **Figura 7.1**.



Schema 7.1: Rappresentazione schematica della sintesi del PHEA-PLA.

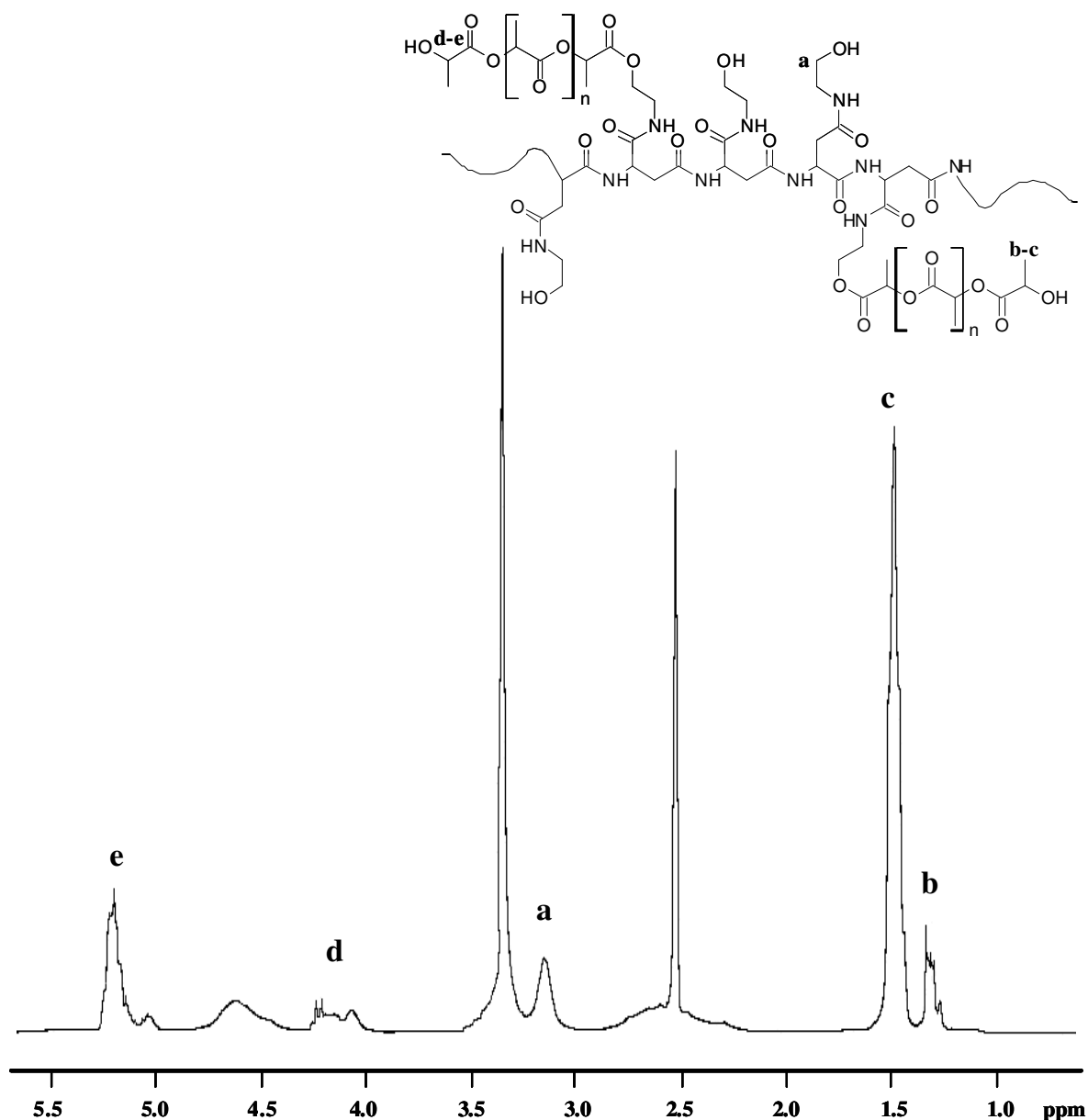


Figura 7.1: Spettro ^1H -NMR del PHEA-PLA in DMSO-d_6 .

Il grado di derivatizzazione dei copolimeri $\text{PHEA-PLA}_{(\text{A})}$, $\text{PHEA-PLA}_{(\text{B})}$ e $\text{PHEA-PLA}_{(\text{C})}$ in PLA (DD_{PLA}) è stato calcolato paragonando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 1.25 e δ 1.45 (segnali **b** e **c** nello spettro ^1H -NMR riportato in **figura 7.1**) così come quello dei protoni a δ 3.9-4.3 e δ 4.9-5.3 (segnali **d** ed **e** dello spettro

riportato in **figura 7.1**) attribuibili rispettivamente a $\text{-O-CO-CH(CH}_3\text{)-O}$ e $\text{-O-CO-CH(CH}_3\text{)-}$ (appartenenti al PLA), con l'integrale relativo ai protoni a δ 3.12 assegnato al $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ (appartenente al PHEA) (segnale **a** nel medesimo spettro $^1\text{H-NMR}$).

Il segnale del PHEA a δ 2.58 non può essere utilizzato in questo calcolo, in quanto risulta parzialmente sovrapposto a quello dell'acqua presente come impurezza nel DMSO deuterato (**figura 7.1**).

Il grado di derivatizzazione in PLA del PHEA-PLA (DD_{PLA}), ottenuto come media di tre determinazioni, è risultato essere pari a 2.4 ± 0.2 , 2.8 ± 0.2 e 4.2 ± 0.3 % in moli, rispettivamente per i copolimeri PHEA-PLA_(A), PHEA-PLA_(B) e PHEA-PLA_(C).

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta reazione tra PHEA e PLA si è avuta dall'esame degli spettri FT-IR del PLA, PHEA e PHEA-PLA, riportati in **Figura 7.2**. Infatti, lo spettro del PHEA-PLA (spettro **c**) mostra i picchi tipici del PLA (spettro **a**): quello presente a 1764 cm^{-1} attribuibile allo *stretching* asimmetrico del C=O del PLA; quello 1384 cm^{-1} attribuibile al *binding* del CH_3 ed il picco a 1180 cm^{-1} corrispondente allo *stretching* del legame C-O-C, i quali sono assenti nello spettro del PHEA (spettro **b**).

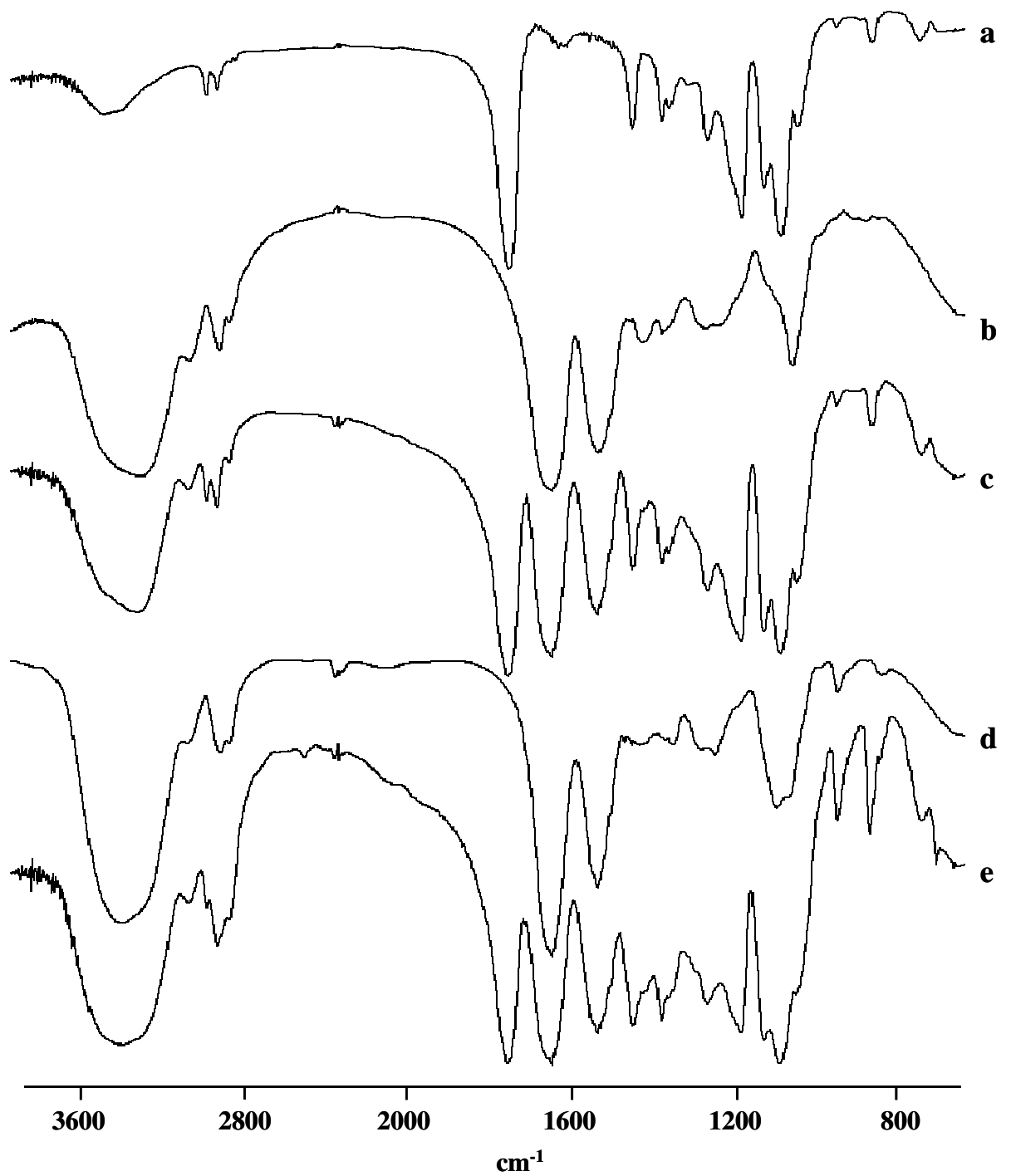


Figura 7.2: Spettri FT-IR del PLA (a), PHEA (b), PHEA-PLA (c), PHEA-PEG₂₀₀₀ (d), PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA (e).

Il copolimero *graft* PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA è stato sintetizzato per reazione tra il derivato peghilato del PHEA, PHEA-PEG₂₀₀₀ [Craparo et al., 2006], ed il PLA attivato mediante l'uso di CDI.

La struttura chimica del copolimero del PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA è riportata in **Figura 7.3**.

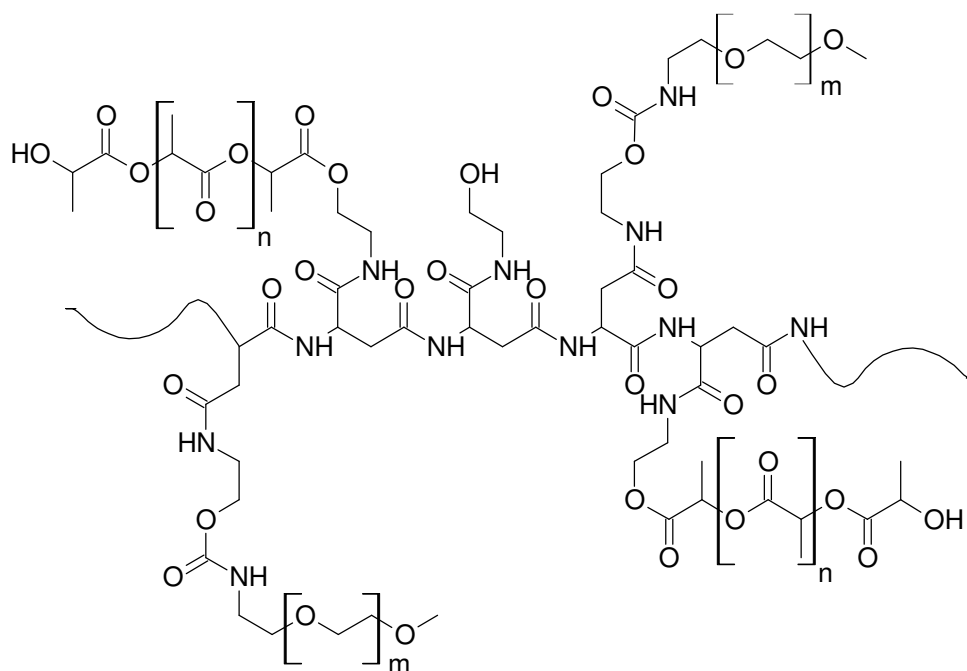


Figura 7.3: Struttura chimica del PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA.

Anche in questo caso sono stati ottenuti copolimeri con tre diversi valori dei gradi di derivatizzazione in PLA (DD_{PLA}).

Le quantità di PLA e CDI utilizzate sono state calcolate in accordo con $R_1=1.2$ e $R_2=0.05, 0.07$ e 0.1 , dove

$$R_1 = \frac{\text{moli di CDI}}{\text{moli di PLA}}$$

ed

$$R_2 = \frac{\text{moli di PLA}}{\text{moli di gruppi idrossilici liberi del PHEA-PEG}_{2000}}$$

I copolimeri ottenuti sono indicati in questo lavoro di tesi come PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(A), PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(C).

Nella **Figura 7.4** è riportato lo spettro ¹H-NMR DMSO deuterato del PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B).

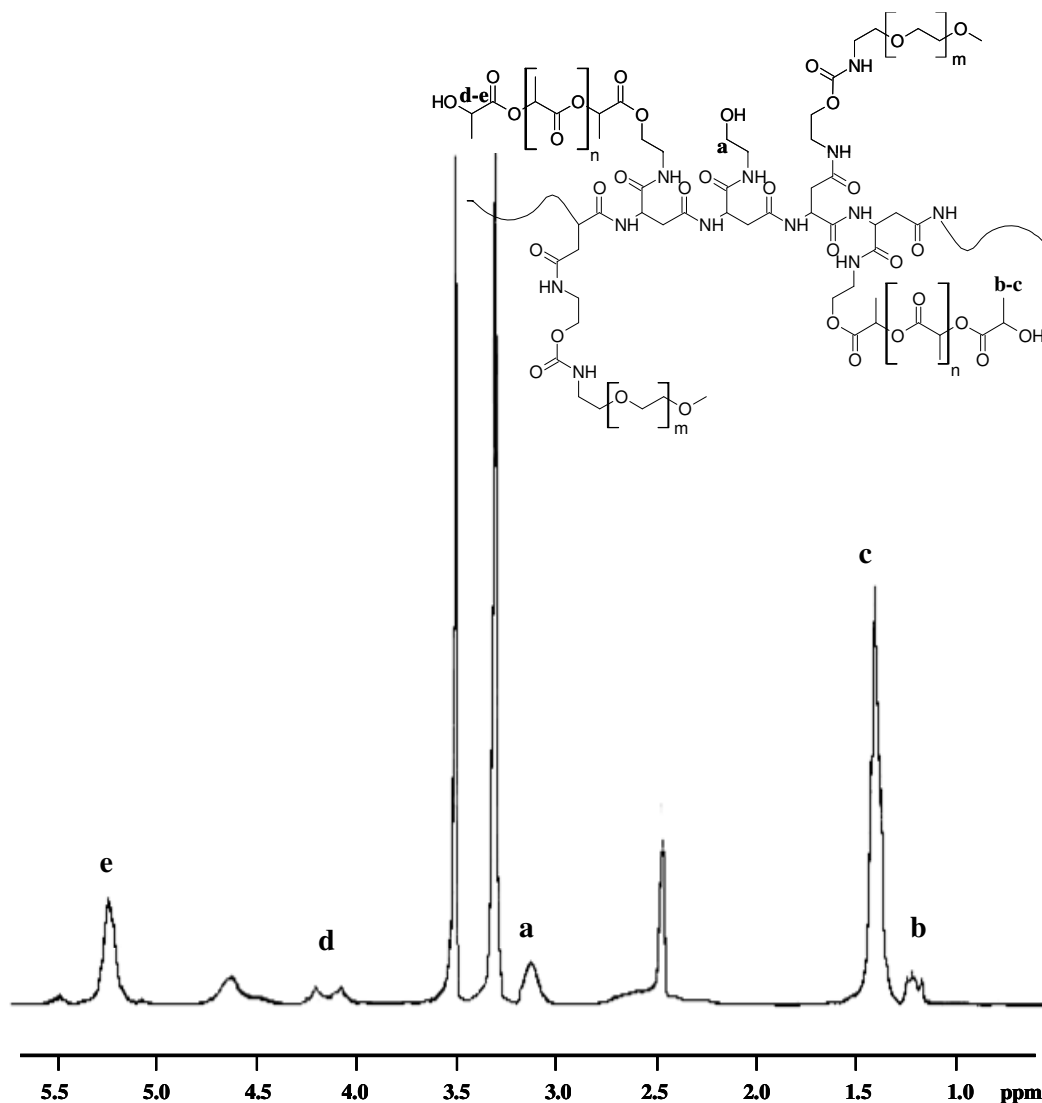


Figura 7.4: Spettro ^1H -NMR del PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA in DMSO- d_6 .

Il grado di derivatizzazione in PEG₂₀₀₀ del PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA (DD_{PEG}) è stato calcolato paragonando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3.50 attribuibili a $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ (appartenente al PEG₂₀₀₀) con l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3.12 corrispondenti a $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ (appartenenti al PHEA) [Craparo *et al.*, 2006].

Tale DD_{PEG} , espresso come valore medio delle tre determinazioni, risulta essere pari a $4.0 \pm 0.5\%$ in moli.

Il grado di derivatizzazione in PLA dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(A), PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(C) è stato calcolato paragonando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 1.25 e δ 1.45 (segnali **b** e **c** nello spettro riportato in **Figura 7.4**) con quelli relativi ai protoni a δ 4.0-4.3 e δ 5.0-5.3 (segnali **d** ed **e** dello spettro riportato in **Figura 7.4**) attribuibili rispettivamente a -O-CO-CH(CH₃)-O- e -O-CO-CH(CH₃)- (appartenenti alle catene legate di PLA), con l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3.12 attribuibili ai protoni -NH-CH₂-CH₂-O- (appartenente al PHEA-PEG₂₀₀₀) (segnale **a** nello spettro in **Figura 7.4**).

Anche in questo caso, il segnale del PHEA a δ 2.58 non può essere utilizzato al fine del calcolo in quanto risulta parzialmente sovrapposto a quello dell'acqua presente come impurità nel DMSO deuterato (vedi **Figura 7.4**).

I valori di DD_{PLA} , espressi come media di tre determinazioni, sono risultati essere pari a 2.6 ± 0.2 , 3.2 ± 0.1 e $4.0 \pm 0.3\%$ in moli rispettivamente per PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(A), PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(C).

Il grado di derivatizzazione in PEG₂₀₀₀ e in PLA dei copolimeri PHEA-PLA e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA sono riassunti in **Tabella 7.1**.

Tabella 7.1: Parametri di reazione, composizione chimica e peso molecolare medio pesato (M_w) dei copolimeri.

Copolimeri	Parametri di reazione		Composizione		Peso molecolare	
	R ₁	R ₂	DD _{PEG}	DD _{PLA}	M _w (kDa)	M _w /M _n
PHEA-PLA_(A)	1.2	0.05	--	2.4±0.2	53.9	1.8
PHEA -PLA_(B)	1.2	0.07	---	2.8±0.2	65.8	1.9
PHEA-PLA_(C)	1.2	0.1	---	4.2±0.3	80.4	1.9
PHEA- PEG₂₀₀₀	---	---	4±0.5	---	38.7	1.8
PHEA- PEG₂₀₀₀ -PLA_(A)	1.2	0.05	4±0.5	2.6±0.2	79.8	1.9
PHEA- PEG₂₀₀₀ -PLA_(B)	1.2	0.07	4±0.5	3.2±0.1	80.1	1.9
PHEA- PEG₂₀₀₀ -PLA_(C)	1.2	0.1	4±0.5	4.0±0.3	85.6	2.0
PHEA	---	---	---	---	25.3	1.7

In **Tabella 7.1** sono anche riportati i valori del peso molecolare medio pesato (M_w) e dell'indice di polidispersità (PDI) dei copolimeri d'interesse, determinati mediante analisi cromatografica ad esclusione dimensionale (SEC). I valori ottenuti sono in accordo con i valori

teorici calcolati considerando i valori di peso molecolare di partenza del PHEA e del PHEA-PEG₂₀₀₀ (vedi **Tabella 7.1**).

Dall'analisi dei dati ottenuti si può dedurre che le condizioni di reazione non hanno prodotto alcuna degradazione a carico dei copolimeri scelti, che hanno permesso quindi di ottenere i copolimeri PHEA-PLA e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA.

7.2 Preparazione e caratterizzazione di Nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B)

Allo scopo di preparare nanoparticelle polimeriche, sono stati scelti come copolimeri di partenza, tra quelli ottenuti e descritti in precedenza, PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), in quanto essi presentano un grado di derivatizzazione opportuno che li rende solubili in solventi clorurati, quali CHCl₃, e insolubili in solvente acquoso.

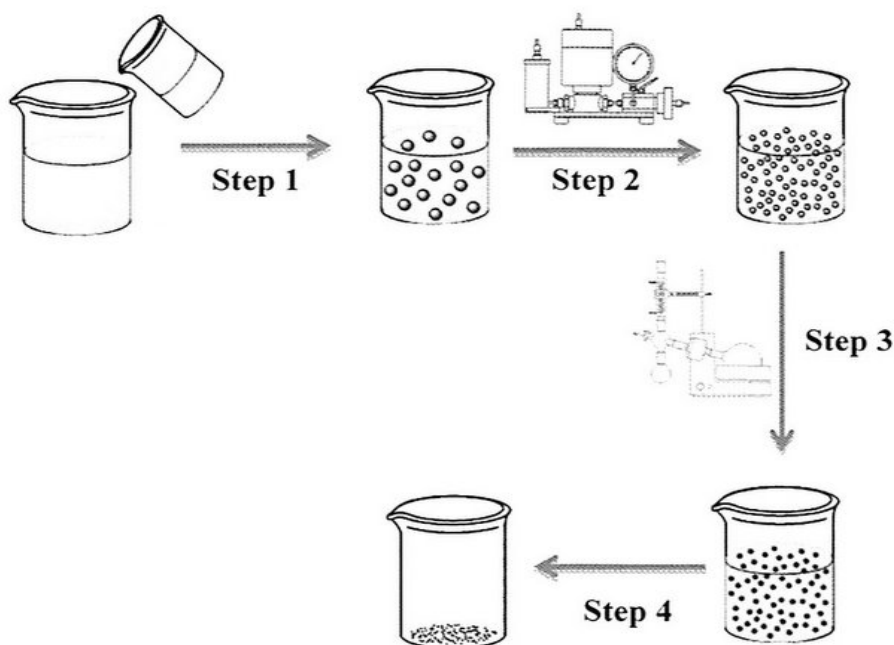
Il copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) viene utilizzato allo scopo di ottenere nanoparticelle con una maggiore funzione *stealth* rispetto alle particelle ottenute a partire dal PHEA-PLA_(C).

Le nanoparticelle polimeriche sono state prodotte a partire da entrambi i copolimeri PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), mediante il metodo dell'omogeneizzazione ad alta pressione e

successiva evaporazione del solvente, già descritto in letteratura [Budhian *et al.*, 2007; Gref *et al.*, 2000].

Questa tecnica permette di ottenere con facilità nanoparticelle monodisperse, e, grazie all'uso di copolimeri anfifilici come quelli sintetizzati in questo lavoro di tesi di Dottorato, di evitare l'uso di uno o più agenti tensioattivi o stabilizzanti, richiesti normalmente per la preparazione di nanoparticelle polimeriche [Patil *et al.*, 2009; Sant *et al.*, 2008; Budhian *et al.*, 2007; Pinto Reis *et al.*, 2006].

Il procedimento completo seguito per la produzione di nanoparticelle a partire dai copolimeri PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) è riportato nello **Schema 7.2**.



Schema 7.2: Rappresentazione schematica della procedura di preparazione delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B).

In particolare, ciascun polimero è stato disciolto in cloroformio e la fase organica ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia alla fase acquosa (step 1 dello schema 2), sotto vigorosa agitazione. L'emulsione primaria olio/acqua così ottenuta è stata diluita con acqua distillata e le gocce di fase dispersa ridotte in dimensioni dell'ordine di nanometri eseguendo una omogeneizzazione ad elevata pressione (step 2).

Infine, è stato estratto il solvente attraverso evaporazione in rotovapor a pressione ridotta; e come conseguenza di tale estrazione il polimero precipita, portando alla formazione di nanoparticelle (step 3) che infine sono state liofilizzate (step 4). Nella **Figura 7.5** sono riportate le immagini SEM delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), ottenute in seguito al processo di liofilizzazione.

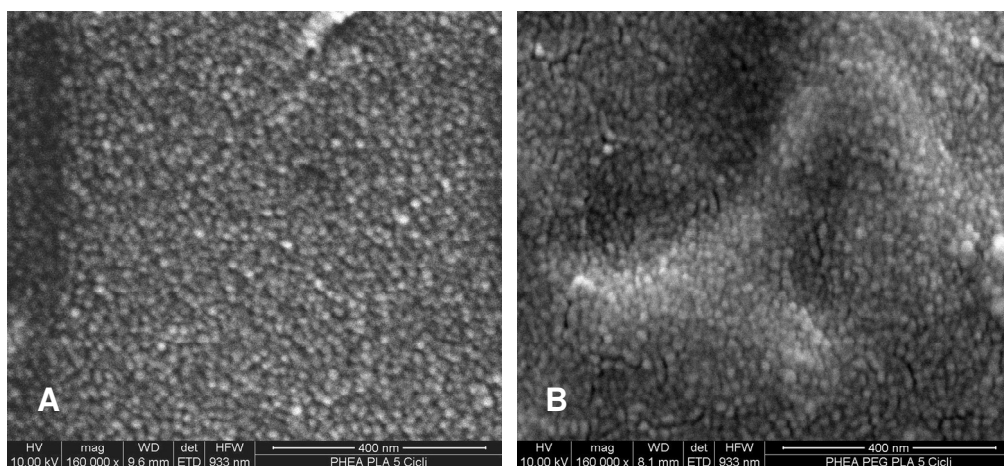


Figura 7.5: Immagini SEM delle nanoparticelle di PHEA -PLA_(C) e PHEA- PEG₂₀₀₀ -PLA_(B). La barra rappresenta 400nm.

Questi sistemi sembrano possedere regolare forma sferica e dimensione omogenea, e sono in accordo con i dati ottenuti dall'analisi delle dimensioni e dell'indice di polidispersità (PDI), riportati in Tabella 2.

Nella **Tabella 7.2** sono inoltre riportati i valori di potenziale zeta delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), misurati in acqua bidistillata.

Tabella 7.2. Dimensioni, indice di polidispersità (PDI) e potenziale zeta delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), prima e dopo liofilizzazione.

Campione	Dimensioni medie (nm)	PDI	Potenziale Zeta (mV) (\pm SD)
Prima della liofilizzazione			
PHEA-PLA (C)	37.71	0.24	-21.4(\pm 7.13)
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -PLA (B)	47.50	0.22	-18.3 (\pm 4.37)
Dopo la liofilizzazione			
PHEA-PLA (C)	55.71	0.22	-19.6 (\pm 7.48)
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -PLA (B)	76.38	0.28	-14.1 (\pm 5.98)

Le nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) mostrano un diametro nel range di una decina di nanometri, rispettivamente, pari a 37.71 e 47.50 nm. Il diametro maggiore delle nanoparticelle di

PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) rispetto a quelle di PHEA-PLA_(C) probabilmente è dovuto alla presenza delle catene di PEG legate al PHEA.

Allo scopo di valutare eventuali fenomeni aggregativi dovuti al processo di liofilizzazione, le analisi di dimensione, indice di polidispersità e potenziale zeta sono state effettuate anche dopo liofilizzazione e ridispersione in acqua bidistillata.

Come mostrato in **Tabella 7.2**, sebbene i campioni di nanoparticelle liofilizzate mostrano valori di dimensione media e PDI più grandi di quelli ottenuti prima della liofilizzazione, questi ultimi sono comunque sempre nel range di una decina di nanometri, rispettivamente 55.17 e 76.32 nm per le nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B).

Questi risultati sono molto importanti perché dimostrano che non è necessario utilizzare agenti disperdenti o crioprotettori, come trealosio o PVA, per favorire la ridispersione delle particelle, probabilmente grazie alla presenza di una *shell* idrofilo sulla superficie delle nanoparticelle, dovuto al PHEA e al PEG, che stabilizza i sistemi colloidali contro l'aggregazione [Budhian *et al.*, 2007; Pinto Reis *et al.*, 2006].

I dati dimensionali, ottenuti in seguito al processo di liofilizzazione, sebbene siano leggermente più grandi di quelli ottenuti prima della liofilizzazione, rendono questi sistemi somministrabili per qualunque via, compresa quella intravenosa.

Nella **Tabella 7.2**, inoltre, sono riportati anche i valori del potenziale zeta delle nanoparticelle, sia prima che dopo il processo di liofilizzazione. Le differenze riscontrate tra le nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) potrebbero essere attribuite alla presenza o meno delle catene di PEG sulla superficie nanoparticellare.

Allo scopo di conoscere la composizione chimica superficiale delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), per dimostrare la presenza sulla superficie, rispettivamente, di PHEA e PEG₂₀₀₀, che stabilizzano le nanoparticelle sia nella fase di preparazione che di conservazione, è stata usata la tecnica della Spettroscopia Fotoelettronica a raggi X (XPS). Attraverso una procedura di *fitting* dei picchi fotoelettronici, è stata valutata così la distribuzione superficiale relativa agli atomi di carbonio, ossigeno e azoto.

La composizione chimica di campioni analizzati, calcolata per ogni specie, è riportata nella **Tabella 7.3**. Le concentrazioni degli elementi sono espresse come percentuale atomica (atom %).

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli estrapolati dall'analisi di nanoparticelle di solo PLA, preparate alle stesse condizioni sperimentali.

Tabella 3. Composizione superficiale delle nanoparticelle di PLA, PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) ottenuti mediante analisi XPS da una procedura di fitting dei picchi fotoelettronici.

Campioni	C 1s			O 1s			N 1s
BE (eV)	285.1	286.6	288.5	531.6	532.5	533.5	399.9
PLA	49.7	9.6	7.0	11.2	8.0	14.5	---
PHEA-PLA (C)	39.2	16.0	7.2	23.3	2.7	6.4	5.2
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -PLA (B)	36.9	21.1	6.6	10.6	16.9	4.4	3.5

Lo spettro del C 1s consiste di tre componenti: un picco maggiore a BE=285.1 eV, che è attribuito ai legami C-C; un picco a BE=286.6 eV che è attribuito ai legami C-O ed un altro componente a BE=288.5 eV riferito ai legami C=O [Moulder *et al.*, 1995].

Il *fitting* delle curve degli spettri del carbonio, ottenuti dall'analisi della superficie delle nanoparticelle di PLA, PHEA-PLA_(C) e PHEA-

PEG₂₀₀₀-PLA_(B) sono riportati nella **Figura 7.6** (a),(b) e (c), rispettivamente.

Sono riscontrabili alcune differenze significative nella composizione della struttura chimica superficiale dei campioni nanoparticellari, dovute principalmente all'aumento delle specie C-O sul campione di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B).

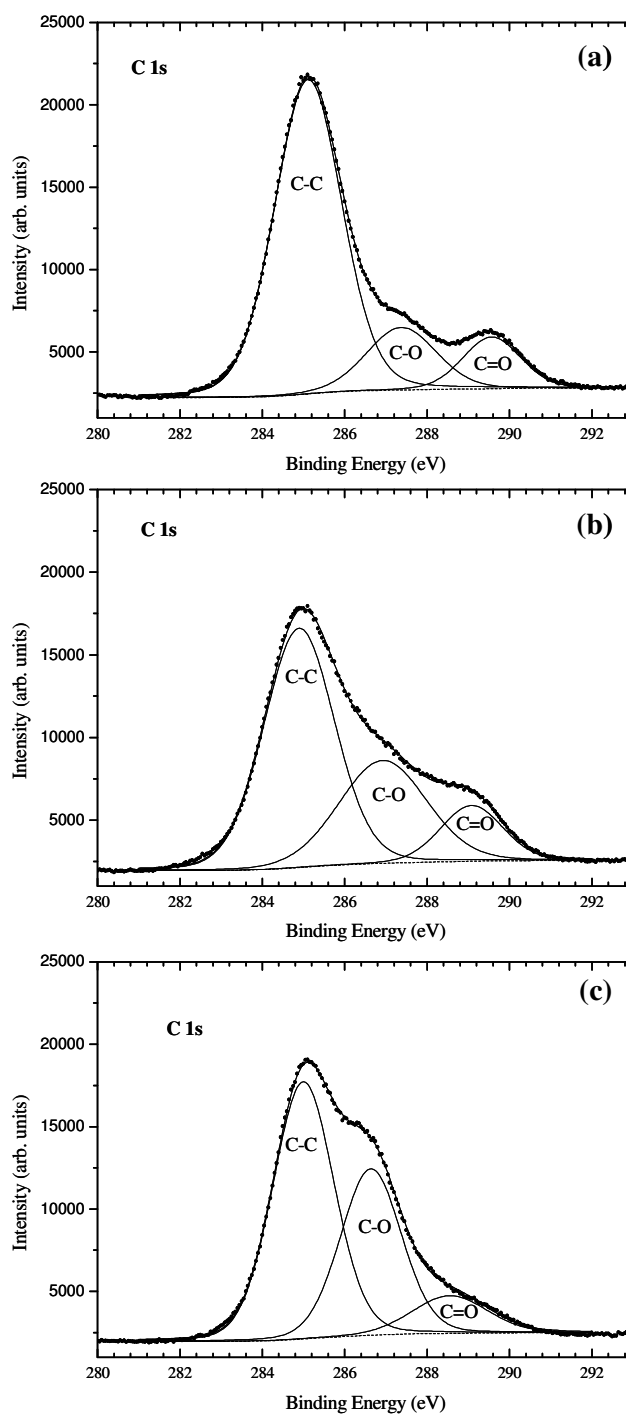


Figura 7.6: Spettri XPS del C 1s e relativo fitting ottenuti dall'analisi superficiale delle nanoparticelle di PLA(a), PHEA-PLA_(C) (b) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) (c).

L'intensità del picco a $BE=286.6$ eV, corrispondente al legame C-O, risulta essere, infatti, maggiore nel campione di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), rispetto alle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e di PLA. Questo picco può essere considerato un indicatore della presenza di PEG sulla superficie del campione di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA, come già riportato in letteratura da altri autori [*Zhang and Feng, 2006; Craparo et al., 2008*].

Come riportato nella **Tabella 7.3** e nella **Figura 7.6**, una quantità minore di atomi di carbonio è stata rilevata come legami C-C ($BE=285.1$ eV) sulla superficie delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) rispetto a quelle di PLA. Questa riduzione può essere spiegata tenendo in considerazione la presenza di macromolecole di PHEA sulla superficie delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), che invece non sono presenti su quelle di PLA.

Lo spettro O 1s, una volta interpolato, mostra un picco a $BE=531.6$ eV che può essere assegnato al legame O-H; una componente a $BE=532.5$ eV che si può attribuire alle specie C-O, ed un picco a $BE=533.5$ che è assegnato al legame O-C=O del gruppo carbossilico (RCOO-) [*Moulder et al., 1995*].

Il *fitting* delle curve degli spettri dell'ossigeno, ottenuti dall'analisi della superficie delle nanoparticelle di PLA, PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) è riportato nella **Figura 7.7** (a),(b) e (c), rispettivamente.

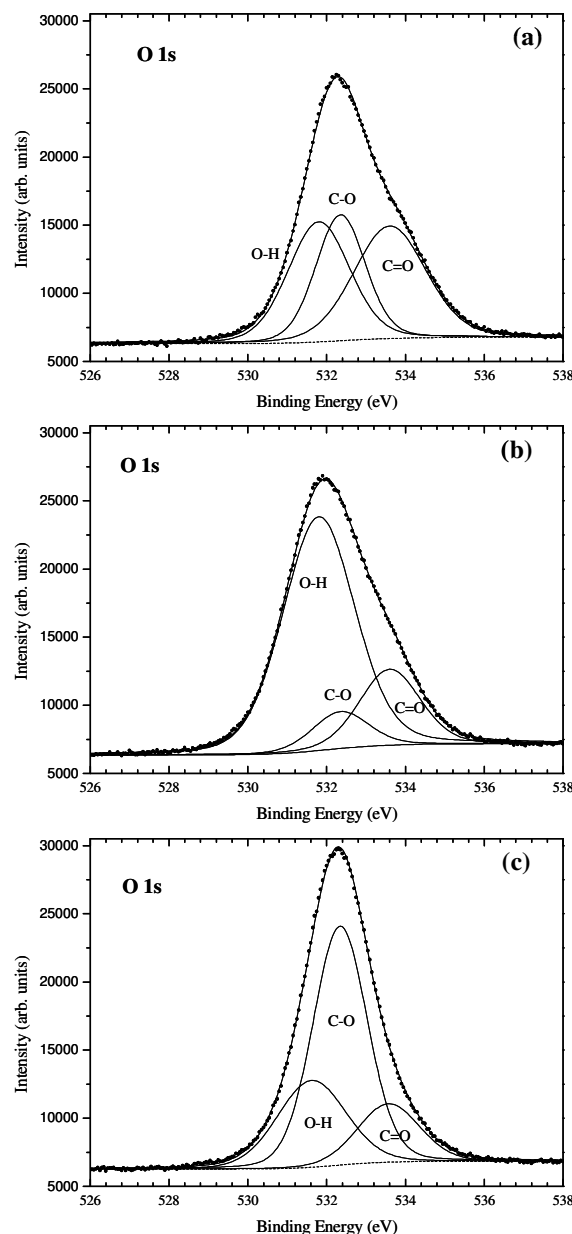


Figura 7.7. Spettri XPS del O 1s e relativi fitting ottenuti dall'analisi della superficie delle nanoparticelle di PLA (a) PHEA -PLA_(C) (b) e PHEA- PEG₂₀₀₀ -PLA_(B) (c).

Le differenze significative nella composizione chimica superficiale delle nanoparticelle di PLA, di PHEA-PLA_(C) e di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), consistono in una maggiore quantità di atomi di ossigeno rilevati come gruppi O-H sulla superficie delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C), ed una maggiore quantità di atomi di ossigeno rilevati come legame C-O sulla superficie delle particelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B).

Come mostrato in **Figura 7.7**, il picco localizzato a BE=531.6V, che corrisponde alla presenza sulla superficie di gruppi OH, aumenta sulla superficie del PHEA-PLA, in accordo alla presenza dei gruppi alcolici, mentre diminuisce sulla superficie del PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), per la presenza delle molecole di PEG. Inoltre, la presenza di residui di PEG sulla superficie delle nanoparticelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) è anche confermata dall'aumento dell'intensità del componente O 1s localizzato a BE=532.5 eV, che corrisponde alla presenza del legame C-O.

Infine, la diminuzione dell'intensità del componente O 1s, che corrisponde alla presenza del legame O=C-O (BE=533.5 eV) sulla superficie dei campioni PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), conferma la riduzione dei gruppi carbossilici superficiali in tali campioni che derivano dal PLA.

Lo spettro N 1s mostra un singolo picco localizzato a $BE=399.9$ eV, attribuito al gruppo amidico del PHEA [*Moulder et al., 1995*].

Tale picco è presente negli spettri XPS delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B), mentre è assente nello spettro delle nanoparticelle di PLA, dimostrando la presenza del PHEA sulla superficie delle nanoparticelle oggetto di questa tesi.

Le differenze nella quantità di azoto presente sulla superficie delle nanoparticelle di PHEA-PLA_(C) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) sono principalmente da attribuire alla presenza di molecole di PEG sulla superficie del campione di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA

8. CONCLUSIONI (III PARTE)

Nel presente lavoro di tesi sperimentale è stata descritta la funzionalizzazione del PHEA con PEG e/o PLA al fine di ottenere due nuovi copolimeri anfifilici a diverso grado di funzionalizzazione, PHEA-PLA_(C) e PHEA- PEG₂₀₀₀-PLA_(B) utilizzando una procedura sintetica che prevede l'uso del CDI.

I copolimeri, ottenuti con l'opportuno grado di funzionalizzazione in PLA, sono stati utilizzati quali materiale di partenza per la preparazione di nanoparticelle, utilizzando il metodo dell'omogeneizzazione ad alta pressione e successiva evaporazione del solvente, evitando l'uso di tensioattivi o agenti di superficie grazie alle proprietà anfifiliche dei copolimeri utilizzati.

Le nanoparticelle ottenute presentano forma sferica e dimensioni nell'ordine di poche decine di nanometri, come dimostrato dall'analisi dimensionale e dalle immagini SEM. I dati ottenuti dall'analisi XPS e di potenziale zeta hanno invece dimostrato la presenza del PEG e/o PHEA sulla superficie, rispettivamente, delle nanoparticelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) e PHEA-PLA_(C).

Inoltre i sistemi nanoparticellari sono stabili alla conservazione e facilmente ridispersibili in acqua, e tali caratteristiche li rendono potenzialmente utilizzabili come sistemi per il *drug delivery*.

9. PARTE SPERIMENTALE

9.1 Materiali e Metodi

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado analitico.

Sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia): acido ferulico, *N,N*-dimetilformamide (DMF), pirene, rodamina B base *N,N*-dimetilacetammide anidra (DMA), disuccinil carbonato (DSC), acetone, pirene, 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI), dimetilsolfossido deuterato (DMSO- d_6) (purezza isotopica 99%), D₂O (con purezza isotopica del 99,9%) e DMF- d_7 (purezza isotopica 99.9%),

Sono stati acquistati dalla Fluka (Italia): O-(2-aminoetil)-O'-metil(polietilen glicole) 2000 Da (PEG₂₀₀₀-NH₂) (<0.4 mmol NH₂/g) e O-(2-aminoetil)-O' metil(polietilen glicole) 5000 Da (PEG₅₀₀₀-NH₂) (<0.17 mmol NH₂/g), O-(2-Aminoetil)-O'-metil poli(etilenglicole) 2000 (PEG₂₀₀₀), esadecilamina (C₁₆), etanolo, etanolamina., dietilammina (DEA), (≤ 0.04 mmol NH₂/g), bis(4-nitrofenil)carbonato (PNPC), etere dietilico, e cloroformio.

Il 1,2-distearoil-*sn*-Glicerolo-3-Fosfoetanolamina-N-[Amino(PolietileneGlicole)₂₀₀₀] (DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂) è stato acquistato da Avanti Polar Lipids, Inc.

Il RESOMER R 202 (D,L- acido polilattico, - PLA 8000 Da) è stato acquistato dalla Bidachem- Boeringher Ingelheim Pharma (Milano).

Il plasma umano e gli eritrociti sono stati ottenuti da donatori sani.

La polisuccinimide (PSI) è stata preparata seguendo un metodo riportato in letteratura [*Giammona et al., 1987*]. L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartamide (PHEA) è stata preparata e purificata secondo le procedure riportate altrove [*Giammona et al., 1987*]. I dati spettroscopici (FT-IR e ¹H-NMR) sono in accordo con i dati riportati [*Mendichi et al., 2000*].

9.2 Cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC)

Il peso molecolare medio pesato (M_w) e la distribuzione del peso molecolare (M_w/M_n) di tutti i copolimeri sintetizzati sono stati determinati tramite cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC).

L'analisi SEC in fase organica è stata effettuata utilizzando due colonne di Phenogel (Phenomenex, dimensione particellare = 5 μ m,

dimensione dei pori = 10^3 Å e 10^4 Å) e un rifrattometro differenziale 410 (DRI) come *detector* di concentrazione (Waters, Mildford, MA, USA). I pesi molecolari sono stati determinati usando i PEO/PEG come standard (*range* 0.232-932 kDa), DMF + 0.01 M LiBr come fase mobile, un flusso di 0.8 ml/min e una temperatura di 50°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$).

Il peso molecolare medio pesato del PHEA (\overline{M}_w) è pari a 41.4 kDa ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.8$).

9.3 Caratterizzazione tramite spettroscopia ^1H -NMR ed FT-IR

Tutti gli esperimenti ^1H -NMR sono stati condotti in acqua deuterata (D_2O , Aldrich), o in Dimetilsolfossido deuterato (DMSO-d_6 , Aldrich), o in N.N-dimetilformamide deuterata (DMF-d_7 , Aldrich) con purezza isotopica del 99,9%, usando uno spettrometro Bruker Avance II 300 operante a 300 MHz. In particolare, gli spettri ^1H -NMR sono stati registrati usando il metodo di soppressione del segnale dell'acqua.

Gli spettri FT-IR sono stati eseguiti in *pellets* di KBr e nel range 4.000-400 cm^{-1} usando uno spettrometro FT-IR Perkin-Elmer 1720 a trasformata di Fourier, con una risoluzione di 1 cm^{-1} e un numero di scansioni pari a 100. Gli spettri sono stati registrati in scala di trasmittanza (%T).

9.4 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆

La sintesi dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è stata effettuata, secondo una procedura già messa a punto presso il laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di tesi di Dottorato [Cavallaro *et al.*, 2004], mediante tre step successivi:

1. Parziale aminolisi di una polisuccinimide (PSI) con O-(amminoetil)-O'-metil poli(etilen glicole) (M_w 2000 o 5000) per ottenere i copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀ e PSI-PEG₅₀₀₀;

2. Parziale aminolisi dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀ e PSI-PEG₅₀₀₀ con esadecilamina (C₁₆) per ottenere i copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PSI-PEG₅₀₀₀-C₁₆;

3. Totale aminolisi degli anelli succinimmidici dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PSI-PEG₅₀₀₀-C₁₆ mediante etanolamina per ottenere i copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆.

9.4.1 Sintesi dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀ e PSI-PEG₅₀₀₀

Una soluzione di O-(2-amioetil)-O'-metil(polietilen glicole) (PEG-NH₂, 2000 o 5000 Da) in DMF è stata aggiunta, a temperatura ambiente, goccia a goccia ad una soluzione di PSI in DMF.

La quantità di PEG è stata scelta in accordo con l'equazione:

$$X = \frac{\text{moli di PEG}}{\text{moli di unità ripetitive di PSI}} = 0.036$$

La miscela di reazione è stata mantenuta a 60°C, sotto argon e continua agitazione, per 15 ore al fine di ottenere il copolimero PSI-PEG₂₀₀₀ e per 30 ore allo scopo di ottenere il copolimero PSI-PEG₅₀₀₀.

Dopo tale tempo, i copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀ e PSI-PEG₅₀₀₀ sono stati precipitati in etere dietilico ed i solidi sono stati lavati diverse volte con metanolo.

Dopo un ultimo lavaggio in acetone i prodotti sono stati quindi seccati sotto vuoto.

9.4.2 Sintesi dei copolimeri *PSI-PEG₂₀₀₀C₁₆* e *PSI-PEG₅₀₀₀C₁₆*

Una soluzione di esadecilamina (C₁₆) in DMF, è stata aggiunta goccia a goccia a 60°C ad una soluzione di PSI-PEG₂₀₀₀ o PSI-PEG₅₀₀₀ in DMF. La quantità di C₁₆ è stata scelta in accordo con l'equazione:

$$Y = \frac{\text{moli di } C_{16}}{\text{moli di unità ripetitive di PSI}} = 0.10$$

La miscela di reazione è stata mantenuta a 60°C per 7 ore sotto argon e sotto continua agitazione. Dopo tale tempo, i copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PSI-PEG₅₀₀₀-C₁₆ sono stati precipitati in etere dietilico e lavati con lo stesso solvente. Infine, dopo un ultimo lavaggio in acetone, i prodotti sono stati essiccati sottovuoto per diverse ore.

9.4.3 Sintesi dei copolimeri *PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆* e *PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆*

La totale aminolisi della PSI è stata ottenuta aggiungendo, goccia a goccia l'etanolina a una soluzione dei copolimeri PSI-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PSI-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in DMF. La miscela di reazione è stata

mantenuta sotto agitazione per tre ore, mantenendo la temperatura di reazione compresa tra 22 e 26° C. Dopo tale tempo, ciascun copolimero è stato isolato per precipitazione in etere etilico, lavato più volte in acetone, seccato a pressione ridotta e purificato mediante dialisi esaustiva con acqua distillata, usando tubi da dialisi Visking con esclusione di peso molecolare 12,000-14,000 Da. Dopo dialisi, i copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ sono stati liofilizzati. La resa dei due copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è risultata essere rispettivamente pari al 90% e 94% (v/v) rispetto alla PSI di partenza. I due polimeri così ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi ¹H-NMR.

Lo spettro ¹H-NMR del PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ in D₂O ha evidenziato segnali a: δ 0.87 (t, 3H, -CH₂-**CH**₃), 1.28 (m, 28H, -CH₂-**CH**₂-CH₂-), 2.80 (m, 2H, -NH-CH-**CH**₂-CO), 3.36 (m, 2H, -NH-**CH**₂-CH₂-OH), 3.63 (m, 2H, -NH-CH₂-**CH**₂-OH), 3.69 (s, 178H, -CH₂-**CH**₂-O-), 4.74 (m, 1H, -NH-**CH**(CO)CH₂-).

Lo spettro ¹H-NMR del PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in D₂O ha evidenziato segnali a: δ 0.87 (t, 3H, -CH₂-**CH**₃), 1.28 (m, 28H, -CH₂-**CH**₂-CH₂-), 2.78 (m, 2H, -NH-CH-**CH**₂-CO), 3.34 (m, 2H, -NH-**CH**₂-CH₂-OH),

3.64 (m, 2H, -NH-CH₂-**CH**₂-OH), 3.69 (s, 454H, CH₂-**CH**₂-O-), 4.72 (m, 1H, -NH-**CH**(CO)CH₂-).

9.5 Sintesi e caratterizzazione del copolimero graft PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

Ad una soluzione di PHEA (40 mg·mL⁻¹) in DMA anidra è stata aggiunta una quantità opportuna di disuccinimidil carbonato (DSC), in modo da avere:

$$R_1 = \frac{\text{moli di DSC}}{\text{moli di unità ripetitive di PHEA}} = 0.08$$

La miscela di reazione è stata mantenuta a 40°C per 3.5 h e dopo tale tempo alla stessa è stata aggiunta una soluzione di DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ in DMA anidra (5.8 mg·mL⁻¹) in modo da avere:

$$R_2 = \frac{\text{moli di DSPE-PEG}_{2000}\text{-NH}_2}{\text{moli di unità ripetitive di PHEA}} = 0.025$$

La miscela di reazione ottenuta è stata portata a 25°C per 18 h e mantenuta in continua agitazione in atmosfera di argon. Dopo tale tempo, la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia a 100 ml dietil etere; il precipitato ottenuto è stato lavato per quattro volte in una miscela dietil etere/CH₂Cl₂ (2:1 v/v) e successivamente una volta

in acetone. Il prodotto solido ottenuto è stato dissolto in acqua bidistillata e la dispersione colloidale ottenuta è stata seccata attraverso un processo di *freeze-drying*. Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 110 % in peso sul peso del PHEA di partenza.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMF-}d_7$) mostra: δ 1.08 (1d, $6\text{H}_{\text{DSPEAPEG}}$ $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2^-$); δ 1.48 (m, $60\text{H}_{\text{DSPEAPEG}}$ $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2^-$); δ 1.79 (m, $2\text{H}_{\text{DSPEAPEG}}$ $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2^-$); δ 3.01 (m, 2H_{PHEA} , -COCHCH $_2$ C(O)NH-); δ 3.48 (t, 2H_{PHEA} -NHCH $_2$ CH $_2$ O-); δ 3.74 (t, $178\ 2\text{H}_{\text{PHEA}}$ -NHCH $_2$ CH $_2$ O-); δ 3.78 (t, $178\ \text{H}_{\text{DSPEAPEG}}$ -CH $_2$ CH $_2$ O-) and δ 4.98 (m, 1H_{PHEA} -NHCHC(O)CH $_2$ -).

Il grado di derivatizzazione in residui di -PEG $_{2000}$ -DSPE ($\text{DD}_{\text{DSPE-PEG}}$) per il copolimero *graft* PHEA-PEG $_{2000}$ -DSPE è stato calcolato attraverso il confronto dell'integrale del picco relativo ai protoni a δ 1.48, relativo a $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2^-$ (appartenenti ai residui -PEG $_{2000}$ -DSPE legati) con gli integrali dei protoni a δ 3.48, relativi al residuo -NHCH $_2$ CH $_2$ O- (appartenente al PHEA). Il $\text{DD}_{\text{DSPE-PEG}}$ è stato espresso come valore medio di tre determinazioni ed è risultato essere 1.5 ± 0.3 % mol.

Lo spettro FT-IR (KBr) del copolimero *graft* PHEA-PEG $_{2000}$ -DSPE

mostra una larga banda centrata a 3400 cm^{-1} (*stretching* asimmetrici degli νOH e degli $\nu\text{NH}_{\text{PHEA}}$); bande a 2917 cm^{-1} (*stretching* $\nu\text{CH}_{\text{PHEA}}$); 1656 cm^{-1} (νCO amidico I_{PHEA}); 1543 cm^{-1} (νCO amidico II_{PHEA}) e 1110 cm^{-1} (*stretching* $\nu\text{C}-\text{O}_{\text{DSPEA-PEG}}$).

Il \overline{M}_w del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, è stato trovato essere pari a 61.0 kDa ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.9$).

9.6 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-PLA

La derivatizzazione del PHEA con PLA al fine di ottenere copolimeri *graft* è stata eseguita utilizzando CDI come agente attivante i gruppi carbossilici del PLA.

Una quantità nota di CDI, dissolta in 0,1 ml di *a*-DMF sotto atmosfera inerte, è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di 3 ml di PLA, anch'esso disciolto in *a*-DMF, in accordo con :

$$R_1 = \frac{\text{moli di CDI}}{\text{moli di PLA}} = 1.2$$

La soluzione limpida è stata lasciata ad agitare a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sotto argon per 4 ore.

Nel frattempo, 83 mg/ml di PHEA sono stati solubilizzati in 1,2 ml di *a*-DMF, posti a 40°C sotto atmosfera di argon e alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti 19 mg/ml di DEA.

Passato il tempo di attivazione del PLA con CDI, la soluzione di PHEA è stata aggiunta lentamente goccia a goccia al PLA attivato, in quantità tali da ottenere tre differenti rapporti in peso tra PHEA e PLA tra polimeri ($R_2=0.05, 0.07$ o 0.1), essendo:

$$R_1 = \frac{\text{moli di PLA}}{\text{moli di gruppi idrossilici liberi nel PHEA}}$$

La reazione è stata lasciata sotto atmosfera inerte ed agitazione continua a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 72 ore. Passato tale intervallo di tempo, la miscela di reazione è stata precipitata in una miscela costituita da etere/diclorometano (15:1 vol/vol) e la sospensione è stata poi centrifugata per 15 minuti, a 11800 rpm e 4°C . Il prodotto è stato recuperato, lavato uno svariato numero di volte con la medesima miscela, al fine di allontanare eventuali tracce di CDI in eccesso, imidazolo liberatosi durante la reazione e PLA non reagito. Infine, il prodotto è stato accuratamente seccato sotto vuoto. I copolimeri di PHEA-PLA sono stati ottenuti con una resa del 100% calcolata in base alla quantità di PHEA utilizzata.

I copolimeri di PHEA-PLA preparati con R_2 pari a 0.05, 0.07 e 0.01 sono indicati in questo lavoro rispettivamente PHEA-PLA_(A), PHEA-PLA_(B) e PHEA-PLA_(C).

I tre copolimeri PHEA-PLA_(A), PHEA-PLA_(B) e PHEA-PLA_(C), sono stati caratterizzati mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, FT-IR e SEC.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ ha evidenziato i segnali δ 1.25 e δ 1.45 (2d, 333 H_{PLA} -O-CO-CH(**CH**₃)- O-); δ 2.58 (m, 2 H_{PHEA} -CO-CH-**CH**₂-CO-NH-); δ 3.12 (t, 2 H_{PHEA} -NH-**CH**₂-CH₂-O-); δ 3.38 (t, 2 H_{PHEA} -NH-**CH**₂-CH₂-O-); δ 3.9-4.3 e δ 4.9-5.3 (m, 111 H_{PLA} -O-CO-**CH**(CH₃)-) e δ 4.65 (m, 1 H_{PHEA} -NH-**CH**(CO)CH₂-).

Lo spettro FT-IR (KBr) ha mostrato delle bande a 3400 cm^{-1} appartenenti ai gruppi OH ed NH del PHEA; a 2917 cm^{-1} corrispondente al CH del PHEA; a 1757 cm^{-1} ; a 1657 cm^{-1} e 1541 cm^{-1} appartenente al C=O dell'amide I e II del PHEA; a 145 cm^{-1} corrispondente al CH del PLA ;a 1382 cm^{-1} del CH₃ del PLA; 1180 cm^{-1} del C-O-C_{PLA} e 1060 cm^{-1} del C-O del PHEA.

9.7 Sintesi del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀

La reazione di derivatizzazione del PHEA con il PEG₂₀₀₀ al fine di ottenere il PHEA-PEG₂₀₀₀, e la sua caratterizzazione sono state eseguite come da procedura già presente in letteratura [*Craparo et al.*, 2006].

Il prodotto ottenuto ha mostrato una resa del 95% p/p calcolato in base alla quantità di PHEA utilizzato. I dati spettroscopici (FT-IR e ¹H-NMR) sono in accordo con quelli riportati in letteratura [*Craparo et al.*, 2006].

Il grado di derivatizzazione in PEG del PHEA- PEG₂₀₀₀ usato in questo lavoro, determinato attraverso analisi ¹H-NMR usando DMSO-*d*₆, è risultato essere pari a 4.0 ±0.5 % mol/mol [*Craparo et al.*, 2006]. Il peso molecolare determinato tramite analisi SEC, è risultato essere 38.7 kDa

9.8 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀- PLA

La reazione di derivatizzazione del PHEA-PEG₂₀₀₀ con PLA per ottenere PHEA-PEG₂₀₀₀- PLA è stata eseguita utilizzando il CDI, seguendo una procedura analoga a quella riportata per il PHEA-PLA. Una quantità nota di CDI, dissolta in 0,1 ml di *α*-DMF sotto atmosfera

inerte, è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di 3 ml di PLA, anch'esso disciolto in *a*-DMF, in accordo con $R_1=1,2$, essendo,

$$R_2 = \frac{\text{moli di CDI}}{\text{moli di PLA}} = 1.2$$

La soluzione limpida è stata lasciata ad agitare a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sotto atmosfera inerte per 4 ore .

Nel frattempo 117 mg/ml di PHEA-PEG₂₀₀₀ sono stati solubilizzati in 1,2 ml di *a*-DMF a 40°C sotto atmosfera inerte di argon e, ad esso sono stati aggiunti 19 mg/ml di DEA.

Passato il tempo di attivazione, la soluzione di PHEA-PEG₂₀₀₀ ottenuta è stata aggiunta lentamente, goccia a goccia, al PLA attivato in quantità tali da ottenere tre differenti rapporti in peso tra PLA e PHEA-PEG₂₀₀₀ ($R_2=0.05, 0.07$ o 0.1), essendo:

$$R_2 = \frac{\text{moli di PLA}}{\text{moli di gruppi idrossilici liberi nel PHEA-PEG}_{2000}}$$

La reazione è stata lasciata sotto atmosfera inerte ed agitazione continua a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 72 ore. Superato tale intervallo di tempo, la miscela di reazione è stata precipitata in una miscela costituita da etere/diclorometano (15:1 vol/vol) e la sospensione è stata poi centrifugata per 15 minuti, a 11800 rpm e 4°C . Il prodotto è stato recuperato, lavato uno svariato numero di volte con la medesima miscela, al fine di allontanare eventuali tracce di CDI in eccesso,

imidazolo formatosi durante la reazione e PLA non reagito. Infine il prodotto è stato accuratamente seccato sotto vuoto. I copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA sono stati ottenuti con una resa del 97% calcolata in base alla quantità di PHEA-PEG₂₀₀₀ utilizzata.

In questa tesi i copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA preparati con R₂ pari a 0.05, 0.07 e 0.01 sono identificati rispettivamente come PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(A), PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(C).

I tre copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(A), PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(B) e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA_(C), sono stati caratterizzati mediante analisi ¹H-NMR, FT-IR e SEC.

Lo spettro ¹H-NMR ha evidenziato i segnali: δ 1.25 e δ 1.45 (2d, 333 H_{PLA} -O-CO-CH (CH₃)- O-); δ 2.58 (m, 2H_{PHEA} -CO-CH-CH₂-CO-NH-); δ 3.12 (t, 2H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-); δ 3.38 (t, 2H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-); δ 3.50 (t, 176 H_{PEG}, -CH₂-CH₂-O-); δ 3.9-4.3 e δ 4.9-5.3 (m, 111 H_{PLA} O-CO-CH (CH₃)-) e δ 4.65 (m, 1H_{PHEA} -NH-CH(CO)CH₂-).

Lo spettro FT-IR (KBr) ha mostrato delle bande a 3400 cm⁻¹ appartenenti ai gruppi OH ed NH del PHEA; a 2971 cm⁻¹ corrispondente al CH del PHEA; a 1757 cm⁻¹ (*stretching* asimmetrico del COO del PLA); a 1657 cm⁻¹ e 1541 cm⁻¹ appartenente al C=O

dell'amide I e II del PHEA; a 1382 cm^{-1} del CH_3 del PLA; 1180 cm^{-1} del $\text{C-O-C}_{\text{PLA}}$; 1100 cm^{-1} del C-O del PEG e 1060 cm^{-1} del C-O del PHEA.

9.9 Determinazione della concentrazione di aggregazione critica (CAC) dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE mediante spettroscopia di fluorescenza

La valutazione della CAC dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE stata effettuata tramite uno studio di fluorescenza in presenza di pirene.

E' stata preparata una soluzione di pirene ($6.0 \times 10^{-2}\text{ M}$) in acetone, conservata a 5°C e all'uso diluita con acqua bidistillata, allo scopo di ottenere una soluzione con una concentrazione di pirene di $12 \times 10^{-7}\text{ M}$.

Tale soluzione è stata posta sotto vuoto a 60°C per 2 ore al fine di rimuovere l'acetone in essa contenuto, quindi è stata aggiunta a diverse dispersioni acquose dei copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, le cui concentrazioni erano comprese in un *range* che andava da 1×10^{-9} a 50 mg/ml . La concentrazione finale di pirene in ogni campione è risultata essere pari a $6.0 \times 10^{-7}\text{ M}$. Le soluzioni

sono state poste in cuvette di quarzo e, prima della registrazione dello spettro, degasate per 5 minuti mediante insufflazione di azoto.

Lo spettro di eccitazione è stato registrato con uno spettrofluorimetro RF-5301PC (Shimadzu, Italia), con apertura pari a 3 mm. La variazione del rapporto di intensità (I_{337}/I_{333}) del pirene in funzione della concentrazione di copolimero è stata calcolata dagli spettri di eccitazione, registrati da 300 a 360 nm e impostando una λ_{em} di 390 nm.

9.10 Preparazione di micelle a partire dai copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

Le micelle polimeriche di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE sono state preparate mediante il metodo della dissoluzione. A 50 mg di polimero, è stata aggiunta acqua bidistillata fino ad un volume finale pari ad 8 ml. La dispersione così ottenuta è stata sonicata per 10 min e, quindi, centrifugata a 25 °C per 10 min, 11,800 rpm. Il surnatante è stato filtrato con un filtro di acetato di cellulosa (0.2 μ m) e liofilizzato.

9.11 Preparazione di nanoparticelle a partire dai copolimeri PHEA-PLA e PHEA- PEG₂₀₀₀ -PLA

Le nanoparticelle ottenute dai copolimeri PHEA-PLA e PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA sono state preparate seguendo il metodo dell'omogeneizzazione ad alta pressione e successiva evaporazione del solvente [*Budhian et al.*, 2007].

Innanzitutto è stato necessario preparare una fase organica contenente il PHEA-PLA od il PHEA-PEG₂₀₀₀-PLA alla concentrazione di 10 mg/ml, utilizzando come solvente il cloroformio.

A questa soluzione organica sono stati addizionati 20 ml di una fase acquosa ottenendo una emulsione primaria attraverso l'uso di un Ultra-Turrax (T 25, Janke &Kunkel Ika – Labortchnik) con una agitazione a 20.500 rpm.

L'emulsione così ottenuta è stata diluita con 50 ml di acqua bi-distillata e successivamente omogeneizzata a 500 bar per 5 cicli.

In particolare, l'omogenizzatore utilizzato è un EmulsiflexTM-c5 della Avestin Inc. (Canada), equipaggiato con un compressore Totem CCS 338 (FIAC, Italia).

Infine, è stato estratto il solvente attraverso evaporazione a pressione ridotta; a conseguenza di ciò il polimero è precipitato portando alla

formazione di nanoparticelle che sono state essiccate mediante liofilizzazione e conservate in freezer per le successive caratterizzazioni.

9.12 Caratterizzazione delle micelle e nanoparticelle: dimensioni medie, PDI e potenziale zeta

Il diametro medio e l'indice di polidispersità (PDI) di ogni campione è stato determinato attraverso spettroscopia a correlazione fotonica (PCS), utilizzando uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK).

Tali misure sono state condotte ad un angolo fisso di 173° e ad una temperatura di 25°C per ciascuna dispersione alla concentrazione di $5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ottenuta usando come mezzo disperdente acqua bi-distillata, soluzione acquosa di NaCl 0.9 % in peso, soluzione tampone fosfato (PBS) a pH 7 o HBS a pH 7.4, filtrati con un filtro da $0.2\text{ }\mu\text{m}$

Ogni dispersione è stata posta all'interno di una cuvetta e analizzata.

Ogni misura è la media di tre determinazioni. La distribuzione dimensionale è stata determinata mediante un algoritmo basato sul metodo NNLS (*Non Negative Least Squares*).

9.13 Incorporazione di Acido Ferulico (AF) e Rodamina B base nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e Beclometasone dipropionato (BDP) nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

La preparazione delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti Acido Ferulico e Rodamina B base e di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE contenenti Beclometasone dipropionato (BDP) è stata realizzata in accordo con una procedura già pubblicata [*Cavallaro et al.*, 2003; *Cavallaro et al.* 2004; *Craparo et al.* 2009].

In particolare, le micelle cariche di AF sono state preparate mescolando una appropriata quantità di copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ o PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e AF al fine di avere un rapporto in peso 2/1. Alla miscela è stato aggiunto 1 ml di etanolo, al fine di solubilizzare il farmaco, e successivamente 0.5 ml di acqua alla volta fino a un volume pari a 8 ml. La dispersione così ottenuta è stata sottoposta a centrifugazione a 11,800 rpm, a 25°C per 10 min, filtrata su filtri in cellulosa acetato 0.45 µm e liofilizzata.

Le micelle cariche di Rodamina B base sono state preparate mescolando una appropriata quantità di copolimeri PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ o PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e Rodamina in maniera tale che il rapporto polimero/Rodamina fosse 5/1 (p/p). Alla miscela è stato aggiunto 1ml di etanolo, al fine di solubilizzare la Rodamina B, e successivamente 0.5 ml di acqua alla volta fino a un volume pari a 8 ml. La sospensione così ottenuta è stata sonicata per 10 min, centrifugata a 11,800 rpm a 25 °C per 10 min, filtrata con un filtro di acetato di cellulosa 0.2 µm e liofilizzata. Per la completa eliminazione delle Rodamina B base libera, le micelle sono state disperse in acqua, purificate tramite dialisi esaustiva (utilizzando tubi da dialisi Spectra/Por MWCO 12,000-14,000) e liofilizzate. La resa delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti Rodamina B base è stata calcolata intorno all' 84% e 78% (p/p) rispettivamente.

Le micelle cariche di BDP sono state preparate miscelando, con pestello e mortaio, un'opportuna quantità di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE e BDP, per ottenere un rapporto finale copolimero/farmaco di 4/1. Successivamente, sono stati aggiunti alla miscela solida 3 mL di etanolo e aliquote da 500 µL di acqua fino a raggiungere un volume di 10 mL. La dispersione così ottenuta è stata sottoposta a

centrifugazione a 11,800 rpm, a 25°C per 10 min, filtrata su filtri in cellulosa acetato 0.45 µm e liofilizzata.

9.14 Drug Loading (DL %)

La quantità di Acido Ferulico (AF) e Rodamina B base nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e Beclometasone dipropionato (BDP) nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE è stata valutata mediante l'uso di tecniche UV e HPLC. I risultati sono stati espressi come Drug Loading (DL%) ovvero rapporto percentuale in peso tra il farmaco incorporato e il sistema totale (micella + farmaco).

9.14.1 Determinazione della quantità di AF

La determinazione della quantità di AF all'interno delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è stata determinata mediante analisi HPLC utilizzando con una colonna C₁₈ a fase inversa (µBondpack, 5µm, 250×46 mm i.d., ottenuta dalla Waters) e come eluente una miscela 2:3 (v/v) di THF/ soluzione acquosa di acido acetico (3%) con un flusso pari a 0.8 ml/min. L'eluato è stato

monitorato tramite spettrofotometro UV a una lunghezza d'onda di 320 nm.

Per determinare la DL%, 5 mg di campione micellare di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenente AF sono stati dispersi in 10 ml di acqua distillata, filtrate con filtro 0.2 µm di acetato di cellulosa e analizzate mediante HPLC. La quantità di AF contenuto nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è stata estrapolata mediante una curva di calibrazione ottenuta a partire da soluzioni standard di AF in etanolo in un range di concentrazione 2.5-50 µg/ml ($y=39556x$, $R^2=0.9942$).

L'analisi UV è stata condotta usando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2401 impostando la lunghezza d'onda a 320 nm. La curva di calibrazione ($y=39556x$; $R^2=0.9987$) è stata ottenuta a partire da soluzioni standard di AF in PBS 0.1 M pH 7.4.

9.14.2 Determinazione della quantità di Rodamina B base

La quantità di Rodamina B base contenuta nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, espressa come percentuale del rapporto tra il peso della Rodamina contenuta nelle micelle e il

peso delle micelle contenenti Rodamina (copolimero + Rodamina B base), si è attestata all'1.2% e allo 0.66%, rispettivamente. Per essere sicuri della presenza di Rodamina all'interno delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ dopo 8 ore di incubazione con le cellule, è stato condotto in vitro uno studio di diffusione della Rodamina dalle micelle nel mezzo di cultura cellulare per 12 ore. Dopo tale periodo, la quantità di Rodamina presente all'interno delle micelle è stata quantificata tramite analisi UV ed è risultata essere il 91% per il PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e l'88% per il PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ della quantità di Rodamina inizialmente presente.

9.14.3 Determinazione della quantità di Beclometasone dipropionato

La determinazione della quantità di Beclometasone dipropionato contenuto nelle micelle è stata effettuata mediante HPLC. L'analisi HPLC è stata realizzata usando una colonna C18 (μ Bondpack, 5 μ m, 250 x 46mm i.d., acquistata da Waters), come fase mobile è stata usata una miscela di metanolo: acqua 30:70 v/v con una flusso di 1 ml \cdot min⁻¹, e sottoponendo l'eluato ad analisi spettrofotometrica a 238 nm. Per la determinazione 5 mg di micelle

contenenti BDP sono state dissolte in 5 mL di acqua bi-distillata, la dispersione ottenuta è stata poi filtrata con un filtro da 0.2 μm in acetato di cellulosa e analizzata all'HPLC. La quantità di BDP incapsulata nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE è stata estrapolata mediante curva di calibrazione ottenuta usando soluzioni standard di BDP in metanolo in un intervallo di concentrazioni tra 100 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($y=43401\cdot 10^{-3}x$, $R^2=0.99696$). I risultati sono stati espressi come rapporto percentuale in peso tra la quantità di farmaco contenuto nelle micelle e il peso del campione contenente farmaco (sistema micelle +BDP).

9.15 Studi di rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in PBS

Una soluzione isotonica di tampone fosfato (PBS) a pH 7.4, mimante il mezzo fisiologico, è stata utilizzata per ottenere il profilo di rilascio dell'AF dalle micelle polimeriche di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆. Una quantità nota di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, contenenti AF è stata dispersa in PBS 0.1M, pH 7.4 e trasferita in un tubo da dialisi Spectra/Por con esclusione di peso molecolare di 10,000 Da. Questi sistemi sono stati poi immersi in

una soluzione di PBS e incubati a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ sotto continua agitazione, in un incubatore orbitante Benchtop 80°C . Dopo il tempo prefissato, è stato prelevato 1ml della soluzione esterna e sostituito con 1ml di PBS fresco. Il campione prelevato è stato filtrato con filtri RC $0.2\ \mu\text{m}$ e sottoposto ad analisi UV e HPLC, come riportato precedentemente, allo scopo di determinare la quantità di farmaco rilasciata. La determinazione della quantità di AF contenuto nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ è stata ottenuta mediante le curve di calibrazione precedentemente descritte.

Per valutare l'assenza di interferenza della membrana con la libera diffusione del farmaco, una quantità appropriata dello stesso farmaco è stata dispersa in PBS (pH 7.4) fino ad ottenere una concentrazione finale pari a quella contenuta all'interno delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e trattata nelle stesse condizioni descritte per le micelle.

9.16 Studi di rilascio di AF dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in plasma umano

Una quantità nota di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, contenenti AF è stata sospesa in plasma umano e quindi trasferita all'interno di un tubo da dialisi Spectra/Por. Ogni tubo è stato immerso in plasma umano e incubato a 37°C \pm 1°C sotto continua agitazione in un incubatore orbitante Benchtop 80°C. Dopo il tempo prefissato è stato prelevato un volume pari a 1.5 ml di mezzo esterno, avendo cura di rimpiazzarlo di volta in volta con lo stesso volume di plasma umano fresco. Per analizzare la quantità di farmaco contenuta nel plasma prelevato, ogni campione è stato centrifugato a 5,000 rpm per 5 minuti; a 1ml di surnatante sono stati aggiunti 2 ml di metanolo e la miscela ottenuta è stata centrifugata a 5,000 rpm per 10 minuti. Trascorso tale periodo di tempo, il surnatante è stato filtrato con filtri RC 0.2 μ m e analizzato tramite analisi UV e HPLC. In particolare, la determinazione della quantità di farmaco rilasciata tramite analisi UV è stata ottenuta mediante curva di taratura realizzata dissolvendo AF a concentrazione note in una miscela metanolo-acqua in rapporto di 2/1 (v/v) ($y = 52.487x$; $R^2 = 0.9978$).

Per valutare l'assenza di interferenza della membrana con la libera diffusione del farmaco, una quantità appropriata dello stesso farmaco è stata dispersa in plasma umano fino ad ottenere una concentrazione

finale pari a quella contenuta all'interno delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e trattata nelle stesse condizioni descritte per le micelle.

9.17 Studi di rilascio di BDP dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE in PBS/Etanolo

Una miscela tra una soluzione di tampone fosfato isotonica (PBS) a pH 7.4 e etanolo 80:20 (v/v) è stata usata per ottenere un profilo di rilascio del BDP dalle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE. In particolare, 10 mg delle micelle liofilizzate contenenti BDP sono state disperse nella miscela e trasferite dentro una membrana da dialisi Spectra/Por (avente come cut-off di peso molecolare 12,000-14,000 Da). Questa membrana da dialisi è stata immersa in 20 ml di mezzo di rilascio pre-riscaldato e incubato a $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ sotto continua agitazione in un incubatore Benchtop modello 420.

Ai tempi prestabiliti, aliquote di 1 mL di soluzione esterna alla membrana sono state prelevate e rimpiazzate con 1 mL di miscela PBS/etanolo fresca. I campioni prelevati sono stati filtrati con filtri RC da 0.2 μm e analizzati mediante HPLC in modo da determinare la quantità di BDP rilasciata. Il profilo di rilascio è stato determinato

confrontando la quantità di farmaco rilasciato in funzione del tempo di incubazione con la quantità totale di farmaco caricato nelle micelle ed esprimendo lo stesso come % in peso di farmaco rilasciato. I dati sono stati corretti prendendo in considerazione la procedura di diluizione.

È stato anche realizzato un esperimento per determinare il comportamento del farmaco libero: una quantità appropriata di BDP è stata dispersa nella miscela PBS/etanolo, 80:20, v/v, in modo da avere una concentrazione finale di BDP uguale a quella caricata nelle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, e posta dentro il tubo da dialisi e immersa dentro il mezzo opportuno di rilascio (vedi sopra). La quantità di BDP è stata rilevata usando la procedura descritta in precedenza.

9.18 Studi di stabilità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE alla conservazione

I test di stabilità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE vuote o contenenti il farmaco, sono stati condotti ponendo le micelle liofilizzate per tre mesi al riparo dalla luce e alla temperatura di 0°C. Trascorso tale periodo, le micelle sono state disperse in acqua bidistillata e caratterizzate in termini di

dimensioni medie e potenziale zeta. Inoltre, è stata valutata la stabilità chimica del farmaco contenuto all'interno delle micelle tramite analisi HPLC e UV con le metodiche precedentemente descritte.

9.19 Studi di stabilità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ in un mezzo mimante le condizioni fisiologiche

La stabilità delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ vuote e di quelle contenenti AF è stata valutata comparando dimensioni, PDI, potenziale zeta e la stabilità del farmaco prima e dopo incubazione delle stesse per 24 ore a 37°C in siero bovino, sotto continua agitazione. In seguito ad incubazione le micelle sono state diluite secondo in rapporto 1:100 (v/v) con una soluzione tampone di HEPES (5mM) a pH 7.4, al fine di evitare eventuali interferenze delle proteine seriche con la misura e sottoposte ad analisi dimensionale, misura del potenziale zeta nonché HPLC e UV con le metodiche precedentemente descritte.

9.20 Studi di solubilità del BDP all'interno delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

La solubilità del BDP in forma libera o in forma micellare è stata determinata ponendo sotto agitazione un eccesso di soluto in H₂O a 25°C. La sospensione è stata sonicata per 10 min, centrifugata a 8000 rpm per 10 min, filtrata su un filtro di membrana di cellulosa rigenerata (RC) con pori di 0.45 nm. La quantità di BDP nella soluzione satura è stata valutata mediante analisi HPLC. La solubilità in acqua del BDP in forma micellare è stata inoltre valutata disperdendo quantità crescenti di micelle contenenti di BDP in un *range* da 10 a 500 mg in 5 ml di acqua. Le dispersioni ottenute sono state filtrate su filtri di RC (0.45 µm) e analizzate all'HPLC.

9.21 Test emolitici su micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

Sono stati utilizzati eritrociti umani ottenuti dal sangue di donatori volontari. Gli eritrociti umani sono stati isolati dal sangue fresco trattato con citrato mediante centrifugazione a 2,200 rpm per 10 min a 4°C. Le cellule sono state lavate quattro volte con PBS a pH 7.4, centrifugate e sospese nello stesso tampone. Gli eritrociti sono stati poi diluiti con lo stesso mezzo fino ad avere una concentrazione finale pari al 4%. Tale dispersione madre è stata preparata fresca e usata entro le 24 h successive alla preparazione.

Nel caso delle micelle polimeriche di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, una dispersione micellare, a concentrazione 2.5 mg/ml in PBS a pH 7.4, è stata aggiunta alla sospensione di eritrociti ed incubata a 37°C per 1 ora, sotto costante agitazione (concentrazione finale del polimero = 1.25 mg/ml).

Nel caso delle micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, vuote e cariche di farmaco, una dispersione micellare è stata miscelata alla dispersione di eritrociti e incubata per 1 h a 37°C sotto costante agitazione (concentrazioni finali del copolimero = 0.5, 0.05 and 0.005 mg·mL⁻¹). Dopo centrifugazione, è stato determinato il rilascio di emoglobina attraverso analisi spettrofotometrica del surnatante a 540 nm. La completa emolisi è stata ottenuta usando una soluzione acquosa di Triton X-100 (5 % in peso) (100% di emolisi) mentre il bianco è stato ottenuto utilizzando PBS a pH 7.4 (0% di emolisi), ed è stata misurata l'assorbanza a 540 nm della dispersione di eritrociti trattata con tale soluzione. Ogni esperimento è stato realizzato in triplicato e ripetuto due volte. La % di lisi degli eritrociti è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\% \text{ lysis} = \frac{(A_{\text{micelles}} - A_{\text{blank}})}{(A_{100\% \text{ lysis}} - A_{\text{blank}})} \times 100$$

dove A_{micelles} è il valore di assorbanza dell'emoglobina rilasciata dagli eritrociti trattati con la dispersione di micelle; A_{blank} è il valore di assorbanza dell'emoglobina rilasciata dagli eritrociti trattati con il PBS, e $A_{100\% \text{ lysis}}$ è il valore di assorbanza dell'emoglobina rilasciata dagli eritrociti trattati con una soluzione al 5% di Triton X-100.

9.22 Studi di citotossicità in vitro su micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE

Mediante saggio MTS a pH 7.4 è stata valutata *in vitro*, la compatibilità cellulare delle micelle polimeriche di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆, PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ sulle linee cellulari Caco-2 (carcinoma al colon), 16-HBE (epitelio bronchiale umano), K-562 (leucemia mieloide cronica umana) e HuDe (fibroblasti del derma umano) e la compatibilità cellulare delle micelle polimeriche di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE sulla sola linea cellulare 16-HBE.

Le cellule utilizzate sono state ottenute dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italia.

Il saggio MTS è basato sulla capacità delle cellule vitali di metabolizzare il sale giallo di tetrazolio in formazano color porpora direttamente solubile nel mezzo di coltura; per effetto della succinato

deidrogenasi mitocondriale (MTS) e in presenza di fenazina metosulfonato (PMS) come accettore di elettroni. Tale capacità è stata misurata dall'assorbanza a 490 nm, che è proporzionale al numero di cellule vitali.

Le linee cellulari Caco-2, 16-HBE e HuDe sono state mantenute nel mezzo MEM (arricchito con il 10% di siero fetale di vitello, 2 mM di L-glutamina, 100 U/ml di Penicillina e 100 µg/ml di Streptomicina) in fiasche di coltura di 25 cm² ed incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂.

La linea cellulare K-562 è stata mantenuta nel mezzo RPMI-1640 (supplementato con il 10% di siero fetale di vitello, 2 mM di L-glutamina, 100 U/ml di Penicillina, 100 µg/ml di Streptomicina e 2.5 µg/ml di Amfotericina B) in condizioni standard (umidità relativa 97%, CO₂ 5%, 37°C).

Un volume di 100 µl di cellule, sospeso ad una densità di 3×10^5 cellule/ml, è stato trasferito in una piastra a 96 pozzetti (0.1 ml per pozzetto) ed incubato a 37°C per 24 ore in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂.

Successivamente il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco e sono stati aggiunti 10 µl per pozzetto di mezzo di coltura

contenente le dispersioni di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆, in quantità tali da ottenere concentrazioni finali pari a 0.05, 0.5 e 5 mg/ml o 10 µL di una miscela contenente il terreno di coltura e le micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE contenenti BDP alla concentrazione finale nell'intervallo compreso tra $7 \cdot 10^{-4}$ - $7 \cdot 10^{-7}$ M.

La vitalità cellulare è stata valutata dopo incubazione delle cellule in presenza delle micelle vuote, ad una concentrazione uguale a quella usata negli esperimenti condotti con le micelle contenenti farmaco. Dopo 24 e 48 h di incubazione, il mezzo di crescita è stato rimpiazzato con 100 µL di MEM fresco e 20 µL di una soluzione di MTS/PMS sono stati aggiunti ad ogni pozzetto, la piastra è stata quindi posta nuovamente ad incubare per ulteriori 3 h a 37°C. L'assorbanza a 490 nm è stata letta usando un Microplate reader (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia). La vitalità cellulare relativa (percentuale) è stata espressa come $(\text{Abs}_{490} \text{ cellule trattate} / \text{Abs}_{490} \text{ cellule di controllo}) \times 100$, come media di dieci valori. Le cellule incubate con il mezzo sono state usate come controllo negativo.

Dopo il tempo di incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco, sono stati aggiunti 20 µl di una soluzione di MTS/PMS ad ogni pozzetto e le piastre sono state incubate per due ore a 37°C.

L'assorbanza a 490 nm è stata registrata usando un lettore Microplate (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

La vitalità cellulare percentuale è stata calcolata mediante la seguente formula:

$$Vitalità\ cellulare\ (\%) = \frac{Abs_{490}^{cell. \ tratt.}}{Abs_{490}^{controllo}} \times 100$$

9.23 Studi di uptake di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-C₁₆ e

PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti Rodamina B base

Cellule monocitarie macrofagiche di topo (J774 A.1) sono state sospese, con densità pari a 4×10^5 cellule/ml, in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) arricchito con FCS, 100U/ml di penicillina, 100 U/ml di streptomicina e 4 mM di glutamina. Le cellule sono state poi trasferite in 24 pozzetti (1 ml per ogni pozzetto) ed incubate a 37°C in atmosfera contenente il 5% di CO₂ per 24 ore. Dopo tale tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con DMEM in modo da rimuovere le cellule non aderite mentre quelle aderite sono state messe ad incubare per 24 ore in DMEM arricchito di antibiotico e FCS. Trascorso tale periodo di incubazione, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100 µl di sospensione di micelle di PHEA-

PEG₂₀₀₀-C₁₆ e PHEA-PEG₅₀₀₀-C₁₆ contenenti Rodamina B base in modo tale che la concentrazione di Rodamina B base in ogni pozzetto fosse uguale a 0.2 mg/ml. La piastra è stata messa ad incubare per 4 e 8 ore. Al termine, le cellule J774 A.1 sono state lavate per due volte con DMEM in modo da eliminare il mezzo fluorescente, libero e contenuto all'interno delle micelle. Successivamente, sono stati aggiunti 50 µl di DMEM ad ogni pozzetto e raschiato il fondo in modo da tirare fuori le cellule aderenti. Una goccia di sospensione cellulare è stata posta su un vetrino e osservata con il microscopio a fluorescenza. Le immagini di fluorescenza e contrasto di fase sono state ottenute tramite microscopio a fluorescenza ZEISS AXIO SKOP 2 PLUS corredato con una camera AXIO HBO 100.

9.24 Studi di uptake di micelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE contenenti BDP

Al fine di analizzare l'*uptake* del BDP all'interno delle cellule, sia in forma libera che caricato all'interno delle micelle polimeriche di PHEA-PEG₂₀₀₀-DSPE, sono state coltivate cellule 16HBE ($2 \cdot 10^5$ cellule mL⁻¹), sono state fatte crescere, in una piastra a 24 pozzetti a 37°C, sotto atmosfera al 5% di CO₂, per 1-2 ore fino alla formazione

di un monostrato confluyente. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state lavate due volte con 0,5 mL di Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) e sono stati aggiunti alle cellule 0,5 mL di mezzo fresco.

Dopo un periodo di preincubazione di 30 min a 37°C, in ogni pozzetto sono state aggiunte aliquote di micelle contenenti il farmaco o di sospensione del farmaco libero, in quantità tale da ottenere una concentrazione di farmaco finale pari a $7 \cdot 10^{-5}$ M e quindi le piastre sono state incubate per 24 e 48 ore. Al termine di tale periodo di incubazione il mezzo è stato rimosso. Il monostrato cellulare è stato lavato per due volte con DPBS e le acque di lavaggio sono state miscelate con il mezzo di coltura. Successivamente, il monostrato cellulare è stato trattato con un opportuno volume di reagente CellLytic MT (Sigma-Aldrich). Dopo incubazione per 15 minuti in uno shaker, le cellule sono state raschiate e il lisato cellulare raccolto e liofilizzato. La quantità di farmaco presente nel lisato cellulare è stata determinata mediante analisi HPLC. È stato verificato che la somma del farmaco internalizzato e non internalizzato presente nelle acque di lavaggio e nel mezzo di coltura è sempre pari al $100\% \pm 4\%$ (dati non riportati).

9.25 Microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FE-SEM)

La morfologia dei sistemi è stata valutata con uno strumento LEO 1530 (FE-SEM). I campioni sono stati depositati sul supporto di silicio sottoforma di dispersione colloidale, seccati e ricoperti di grafite allo scopo di evitare effetti dovuti alla carica.

9.26 Analisi di Microscopia a Scansione Elettronica (SEM)

Sulle nanoparticelle di PHEA-PLA e PHEA- PEG₂₀₀₀ –PLA sono stati effettuati studi morfologici, utilizzando un microscopio a scansione elettronica ESEM FEI Quanta 200F.

I campioni sono stati posti su un doppio nastro adesivo applicato in precedenza su un *stub* di acciaio inox. Questi campioni sono stati successivamente metallizzati spruzzando oro e poi analizzati dal sistema.

9.27 Analisi chimica di superficie

La composizione chimica superficiale dei campioni PHEA-PLA e PHEA- PEG₂₀₀₀ –PLA è stata studiata mediante analisi XPS in una camera ad alto vuoto (UHV), alla pressione di circa 10^{-8} Torr. Gli

spettri di fotoemissione sono stati registrati mediante uno spettrometro VG Microtech ESCA 3000 Multilab, dotato di una sorgente di eccitazione standard AL K_{α} ($h\nu=1486.6$ eV). La scala dell'energia di legame (BE) è stata calibrata attraverso la misurazione del picco del C 1s (BE=285.1 eV) dalla contaminazione di superficie. Le misure registrate presentano un'accuratezza di ± 0.1 eV. L'analisi degli spettri è stata effettuata mediante un *fitting* non lineare dei picchi in modo da separare gli elementi in differenti ambienti clinici.

9.28 Analisi statistiche

L'analisi statistica dei campioni è stata valutata usando un t-test di Student considerando statisticamente significativi i valori $p < 0.05$. Tutti i dati sono riportati come la media \pm la deviazione standard, salvo indicazione contraria.

10. BIBLIOGRAFIA

- Allen C., Maysinger D., Eisenberg A., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **1999**, 16, 3.
- Allen C., Yu Y., Maysinger D., Eisenberg A., *Bioconj Chem*, **1998**, 9, 564.
- Allen T.M., *Adv Drug Deliv Re*, **1994**, 13, 285.
- Allen TM., *Nat Rev Cancer*, **2002**, 2, 750.
- Andrianov K. and Payne L.G., *Adv Drug delivery Rev*, **1998**, 34, 155.
- Antoni G., Neri P., Pedersen T.G., Ottesen M., *Biopolymers*, **1974**, 13, 1721.
- Bader H., Ringsdorf H., Schmidt B., *Angew Makromol Chem*, **1984**, 123, 457.
- Benahmed A., Ranger M., Leroux J.C., *Pharm. Res*, **2001**, 18, 323.
- Benoit J.P., Courteille F., Thies C., *Int J Pharm*, **1986**, 29, 95.
- Berube D., *Nano-hype: the truth behind the nanotechnology buzz*. Amherst, NY: Prometheus, **2006**.
- Bhadra D., Bhadra S., Jain S., Jain N.K., *Int J Pharm*, **2003**, 257, 111.
- Bilati U., Allemann E., Doelker E., *AAPS Pharm Sci Technol*, **2005**, 6, 594.
- Borm P.J., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J.,

- Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E., *Part Fibre Toxicol*, **2006**, 3, 11.
- Breunig M., Bauer S., Goepferich A., *Eur J Pharm Biopharm*, **2008**, 68, 112.
 - Brower V., *J Natl Cancer Inst*, **2006**, 98, 9.
 - Brown D.M., Donaldson K., Borm P.J., Schins R.P., Dehnhardt M., Gilmour P., Jimenez L.A., Stone V., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **2004**, 286, 34453.
 - Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K., *Toxicol Appl Pharmacol*, **2001**, 175, 191.
 - Budhian A., Siegel S.J., Winey K.I., *Int J Pharm*, **2007**, 336, 367.
 - Calvo P., Gouritin B., Brigger I., Lasmezas C., Deslys J., Williams A., Andreux J.P., Dormont D., Couvreur P., *J Neurosci Methods*, **2001**, 111, 151.
 - Cameron N.S., Corbierre M.K., Eisenberg A., *Can J Chem*, **1999**, 77, 1311.
 - Cavallaro G., Licciardi M., Caliceti P., Salmaso S., Giammona G., *Eur J Pharm Biopharm*, **2004**, 58, 151.
 - Cavallaro G., Licciardi M., Giammona G., Caliceti P., Semenzato A., Salmaso S., *J Contr Rel*, **2003**, 89, 285.
 - Cavallaro G., Licciardi M., Giammona G., Caliceti P., Semenzato A., Salmaso S., *J Controlled Release*, **2003**, 89, 285.
 - Cavallaro G., Maniscalco L., Licciardi M., Giammona G., *Macromol Biosci*, **2004**, 4, 1028.
 - Cavallaro G., Pitarresi G., Licciardi M., Giammona G., *Bioconjugate Chem*, **2001**, 12, 143.

- Cavallaro G., Scirè S., Licciardi M., Ogris M., Wagner E., Giammona G., *J Controlled Release*, **2008**, 131, 55.
- Choi S.W., Kim J.H., *J Control Release*, **2007**, 122, 24.
- Chonn A., Semple S.C., Cullis P.R., *Biochim Biophys Acta*, **1991**, 1070, 215.
- Chonn A., Semple S.C., Cullis P.R., *J Biol Chem.*, **1992**, 267, 18759.
- Chorny M., Cohen-Sacks H., Fishbein I., Danenberg H.D., Golomb G., *Tissue Engineering and Novel Delivery Systems*, **2004**, 393, 422.
- Chorny M., Fishbein H., Danenberg H., Golomb G., *J Contr Rel*, **2002**, 83, 389.
- Cohen S., Bernstein H. (Eds.), *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, Marcel Dekker, New York, **1996**.
- Costantino L., Gandolfi F., Tosi G., Rivasi F., Vandelli M.A., Forni F., *J Control Release* **2005**, 108, 84.
- Craparo E.F., Cavallaro G., Bondi M.L., Mandracchia D., Giammona G., *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 3083.
- Craparo E.F., Cavallaro G., Ognibene M.C., Teresi G., Bondi M.L., Giammona G., *J Drug Targeting*, **2009**, 17, 78.
- Craparo E.F., Ognibene M.C., Casaletto M.P., Pitarresi G., Teresi G., Giammona G., *Nanotechnology*, **2008**, 19, 485603.
- Creutz S., Van Stam J.J., De Schryver F.C., Jerome R., *Macromolecules*, **1998**, 31, 681.

- Dabholkar D.R., Sawant R.M., Mongayt D.A., Devarajan P.V., Torchilin V.P., *Int J Pharm*, **2006**, 315, 148.
- Dash P.R., Read M.L., Fisher K.D., Howard K.A., Wolfert M., Oupicky D., Subr V., Strohalm J., Ulbrich K., Seymour L.W., *J Biol Chem*, **2000**, 275, 3793.
- Davidsen J., Vermehren C., Frokjaer S., *Int J Pharm*, **2001**, 214, 67.
- Delgado G.C., *Mundo Nano, Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnologia* **2008**, 1, 89.
- Derek W. and Davis M.E., 99 *Biotech. & Bioeng'g* 975 (**2008**).
- Donbrow M. (Ed.). *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy*. CRC Press, Boca Raton, FL, **1992**.
- Dorr R.T., *Ann Pharmacother*, **1994**, 28, 11.
- Duclairoir C., Nakache E., Marchais H., Orecchioni A.M., *Colloid Polym Sci*, **1998**, 276, 321.
- Duncan R. (**2003**) Polymer-drug conjugates. In Budman, C. H. and Rowinsky, E. (eds.). *Handbook of Anticancer Drug Development* (New York: Lippincott, Williams & Wilkins) pp. 239-260.
- Elamanchili P., Diwan M., Cao M., Samuel C., *J Vaccine* **2004**, 22, 2406.
- Felder B., Blanco-Prieti M.J., Heizmann J., Merkle H.P., Gander B., *J Microencaps*, **2003**, 20, 553.
- Ferguson L.R., Chavan R.R., Harris P., *J Nutr Cancer*, **2001**, 39, 155.
- Ferrari M., *Nat Rev Cancer* **2005**, 5, 161.

- Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammoury N., Benita S., *Int J Pharm*, **1989**, 1, 55.
- Feynman R., *Engineering and Science*, 23, 5, February, pp. 22-36 **1960**.
- Frankel A.D., Pabo C.O., *Cell*, **1988**, 55, 1189.
- Frietas M., Marchetti M., *J Int Pharm*, **2005**, 295, 201.
- Gaber N.N., Darwis Y., Peh K.K., Tan Y.T.F., *J Nanosci Nanotechnol*, **2006**, 6, 3095.
- Ganachaud F. and Katz J., *Chem Phys Chem*, **2005**, 6, 209.
- Gao J., Ming J., He B., Fan Y., Gu Z., Zhang X., *Eur J Pharm Sci*, **2008**, 34, 85.
- Gao Z. and Eisenberg A., *Macromolecules*, **1993**, 26, 7353.
- Gao Z.G., Fain H.D., Rapoport N., *J Control Release*, **2005**, 102, 203.
- Giammona G., Carlisi B., Palazzo S., *J Polym Sci*, **1987**, 25, 2813.
- Green J.P., *17 Annals of Oncology*, **2006**, 1263.
- Green M., Loewenstein P.M., *Cell*, **1988**, 55, 1179.
- Gref R., Luck M., Quellec P., Marchand M., Dellacheire E., Harnisch S., Blunk T., Muller R.H., *Colloids Surf B*, **2000**, 18, 301.
- Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V., Langer R., *Science*, **1994**, 28, 1600.
- Hagan S.A., Coombes A.G.A., Garnett M.C., Dunn S.E., Davies M.C., Illum L.L., Davis S.S., *Langmuir*, **1996**, 12, 2153.
- Harada A. and Kataoka K., *Macromolecules*, **1998**, 31, 288.

- Hariharan S., Bhardwaj V., Bala I., Sitterberg J., Bakowsky U., Ravi Kumar M.N., *Pharm Res*, **2006**, 23, 184.
- Helle A., Hirsjärvi S., Peltonen L., Hirvonen J., Wiedmer S.K., Hyötyläinen T., *J Pharm Biomed Analysis*, **2010**, 51, 125.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Ibrahim H., Bindschaedler C., Doelker E., Buri P., Gurny R., *Int J Pharm*, **1992**, 87, 239.
- Ichihashi M., Ueda M., Budiyo A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T., *Toxicology*, **2003**, 189, 21.
- Igami M. and Okazaki O., *STI Working Paper 2007/4. Directorate for Science, Technology and Industry. OECD*; **2007**, May 23rd.
- Jain K.K., *Tech Cancer Res Treat*, **2005**, 4, 407.
- Jain R.A., *Biomaterials*, **2000**, 21, 2475.
- Jeffery H., Davis S., O'Hagan D., *Int J Pharm*, **1991**, 77, 169.
- Jeong Y.I., Cheon J.B., Kim S.H., Nah J.W., Lee Y.M., Sung Y.K., Akaike T., Cho C.S., *J Contr Rel*, **1998**, 51, 169.
- Johnson S.D., Anderson J.M., Marchant R.E., *J Biomed Mater Res*, **1992**, 26, 915.
- Jones M.C., Leroux J.C., *Eur J Pharm Biopharm*, **1999**, 48, 101.
- Jule E., Nagasaki Y., Kataoka K., *Bioconj Chem*, **2003**, 14, 177.
- Kabanov A.V., Chekhonin V.P., Alakhov V.Y., Batrakova E.V., Lebedev A.S., Melik-Nubarov N.S., Arzhakov S.A.,

- Levashov A.V., Morozov G.V., Severin E.S., *FEBS Lett.*, **1989**, 258, 343.
- Kabanov A.V., Kabanov V.A., *Adv Drug Deliv Rev*, **1998**, 30, 49.
 - Kale A.A. and Torchilin V.P., *J Drug Targ*, **2007**, 15, 7, 538.
 - Kampa M., Alexaki V.I., Notas G., Nifli A.P., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtzoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E., *Breast Cancer Res*, **2004**, 6, 63.
 - Katayose S., Kataoka K., *J Pharm Sci*, **1998**, 87, 160.
 - Kim J.H., Kim Y.S., Park K., Kang E., Lee S., Nam H.Y., Kim K., Park J.H., Chi D.Y., Park R.W., Kim I.S., Choi K., Chan Kwon I., *Biomaterials*, **2008**, 29, 1920.
 - Kim S.Y., Shin I.G., Lee Y.M., Cho C.G., Sung Y.K., *J Contr Re.*, **1998**, 51, 13.
 - Kjolberg K., Strand R., Delgado G.C., Wickson F., *Technology Analysis & Strategic Management*, **2008**, 20, 83.
 - Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L., *FEBS Lett*, **1990**, 268, 235.
 - Koziara J.M., Whisman T.R., Tseng M.T., Mumper R.J., *J Control Release* **2006**, 112, 312.
 - Kwon G.S. and Kataoka K., *Adv Drug Deliv Rev*, **1995**, 16, 295.
 - Kwon G.S. and Okano T., *Adv Drug Deliv Rev*, **1996**, 21, 107.
 - Kwon G.S., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **1998**, 15, 481.
 - Kwon G.S., Naito M., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka Y., *J Contr Rel*, **1997**, 48, 195.

- La S.B., Okano T., Kataoka K., *J Pharm Sci*, **1996**, 85, 85.
- Langer R., *Pharm Res* **1997**, 14, 840.
- Lannibois H., Hasmy A., Botet R., Aguerre Chariol O., Cabane B. *J Phys II*, **1997**, 7, 319.
- Lannibois-Drean H., *Des molécules hydrophobes dans l'eau: fabrication de nanoparticules par precipitation*. Ph.D. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, **1995**.
- Lasic D.D. and Martin F. (Eds.), *Stealth Liposomes*, CRC Press, Boca Raton, **1995**.
- Lasic D.D., Martin F.G., Gabizon A., Huang S.K., Papahadjopoulos D., *Biochim Biophys Acta*, **1991**, 1070, 187.
- Lassalle V. and Ferreira V., *Macromol Biosci*, **2007**, 7, 767.
- Lavasanifar A., Samuel J., Kwon G.S., *Colloids Surf B: Biointerfaces*, **2001**, 22, 115.
- Leamon C.P., Low P.S., *Drug Discov Today*, **2001**, 6, 44.
- Lee Y.S., *Arch Pharmacol Res*, **2005**, 8, 1183.
- Legrand P., Lesieur S., Bochot A., Gref R., Raatjes W., Barratt G., Vauthier C., *Int J Pharm*, **2007**, 344, 33.
- Lenaerts V., Nagelkerke J.F., Van Berkel T.J., Couvreur P., Grislain L., Roland M., Speiser P., *J Pharm Sci* **1984**, 73, 980.
- Leroux J.C., Allemann E., Doelker E., Gurny R., *Eur J Pharm Biopharm*, **1995**, 41, 14.
- Leroux J.C., De Jaeghere F., Anner B., Doelker E., Gurny R., *Life Sci* **1995**, 57, 695.
- Lesca P., *Carcinogenesis*, **1983**, 4, 1651.

- Li G.L., Wang J.J., Wang J.Z., Liu Y.Y., Jin Y. Effect of ferulic acid on the proliferation of nerve cells of retinas in vitro. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 39 (2003) 650-654.
- Liaw J., Chang S.F., Hsiao F.C., *Gene Ther*, **2001**, 8, 999.
- Loo C., *3 Tech Cancer Res Treatment*, **2004**, 33.
- Lu W., Sun Q., Wan J., She Z., Jiang X.G., *Cancer Res*, **2006**, 66, 11878.
- Lukyanov A.N., Torchilin V.P., *Adv Drug Delivery Rev*, **2004**, 56, 1273.
- Luppi B., Orienti I., Bigucci F., Cerchiara T., Zuccari G., Fazzi S., Zecchi V., *Drug Deliv*, **2002**, 9, 147.
- Lux Research. *The nanotech report. Investment overview and market research for nanotechnology*. United States: Lux Research; **2006**.
- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y. and Hori K., *J Control Release*, **2000**, 65, 271.
- Marjan J., Xie Z., Devine D.V., *Biochim Biophys Acta*, **1994**, 1192, 35.
- Marques C.M., *Langmuir* **1997**, 13, 1430.
- Marsh D., Bartucci R., Sportelli L., *Biochim Biophys Acta Biomembranes*, **2003**, 1615, 33.
- Martin A. in: *Physical Pharmacy*, 4th Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, **1993**, 396.
- Matsumara Y., Hamaguchi T., Ura T., Muro K., Yamada Y., Shimada Y., Shirao K., Okusaka T., Ueno H., Ikeda M and Watanabe N., *British Journal of Cancer*, **2004**, 91, 1775.

- Matsusue Y., Matsusue Y., Hanafusa S., Yamamuro T., Shikinami Y., Ikada Y., *Clin Orthop Relat Res*, **1995**, 246, 53.
- Maynard A., Washington, DC; *Woodrow Wilson International Center for Scholars*, **2006**.
- McCarthy T.D., Karellas P., Henderson S.A., Giannis M., O'Keefe, Heery D.F, Paull J.R., Matthews B.R., Holan G., *Mol Pharmacol*, **2005**, 2, 312.
- Micha JP., 100 *Gynecologic Oncology* 437 (**2006**)
- Miller D.W., Batrakova E.V., Waltner T.O., Alakhov V.Y., Kabanov A.V., *Bioconj Chemj*, **1997**, 8, 649.
- Mitra A., Nan A., Line B.R., Ghandehari H., *Curr Pharm Des* **2006**., 12, 4729.
- Mittal K.L. and B. Lindman (eds.), *Surfactants in Solution* (vols. 1Y3), Plenum, New York, **1991**.
- Moghimi S.M., *Biochim Biophys Acta*, **2002**, 1590. 131.
- Moghimi SM, Hunter A. and Murray J.C., *Faseb J*, **2005**, 19, 3, 331.
- Moneghini M., Voinovich D., Princivale F., Magarotto L., *Pharm Dev Technol*, **2000**, 5, 347.
- Monsky W.L., Fukumura D., Gohongi T., Ancukiewicz M., Weich H.A., Torchilin V.P. et al., *Cancer Res*, **1999**, 59, 4129.
- Moulder J.F., Stickle W.F., Sobol P.E., Bomben K.D., Eds Chastain J and King R C Jr, Phys. Electronics Inc., (USA: Eden Prairie) **1995**.
- Muller R.H., *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany, and CRC Press, Boca Raton, FL, **1991**

- Muranishi N., Takagi N., Muranishi S., Sezaki H., *Chem Phys Lipids*, **1981**, 28, 269.
- Nakanishi T., Fukushima S., Okamoto K., Suzuki M., Matsumura Y., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K., *J Control Release*, **2001**, 74, 295.
- Nam Y.S., Kang H.S., Park J.Y., Park T.G., Han S.H., Chang I.S., *Biomaterials*, **2003**, 24, 2053.
- Nordmann A. *Converging technologies: shaping the future of European societies. Brussels: European Commission; 2004.*
- O'Neal D.P., *Cancer Letters*, **2004**, 209, 171.
- Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R., Wagner E., *Gene Ther*, **1999**, 6, 595.
- Oldenburg S.J., *Applied Phys Letters*, **1999**, 2897.
- Ono K., Hirohata M., Yamada M., *Biochem and Biophys Research Comm*, **2005** 336, 444.
- Owens III D.E., Peppas N.A., *Int J Pharm*, **2006**, 307, 93.
- Palmer T.N., Caride V.J., Caldecourt M.A., Twickler J., Abdullah V., *Biochim Biophys Acta*, **1984**, 797, 363.
- Pang S.N.J., *J Am Coll Toxicol*, **1993**, 12, 429.
- Panyam J., Dali M.M., Sahoo S.K., Ma W., Chakravarthi S.S., Amidon G.L., Levy R.J., Labhasetwar V., *J Control Release*, **2003**, 92, 173.
- Panyam J., Labhasetwar V., *Adv Drug Deliv Rev*, **2003**, 55, 329.
- Panyam J., Labhasetwar V., *Mol Pharm*, **2004**, 1, 77.
- Park E.K., Kim S.Y., Lee, S.B. Lee Y.M., *J Control Release*, **2005**, 109, 158.
- Park E.K., Lee S.B., Lee Y.M., *Biomaterials*, **2005**, 26, 1053.

- Patil Y.B., Toti U.S., Khdair A., Ma L., Panyam J., *Biomaterials*, **2009**, 30,859
- Peltonen L., Koistinen P., Karjalainen M., Hakkinen A., Hirvonen J., *AAPS Pharm Sci Technol*, **2002**, 3, article 32.
- Peracchia M.T., S.T.P., *Pharma Sci*, **2003**, 13, 155.
- Pinto Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2006**, 2,8.
- Pitarresi G., Casadei M.A., Mandracchia D., Paolicelli P., Palumbo F.S., Giammona G., *J Controlled Release*, **2007**, 119, 328.
- Powell G.M., *Polyethylene glycol*, in: R.L. Davidson (Ed.), *Handbook of Water Soluble Gums and Resins*, McGraw-Hill, New York, **1980**, 1.
- Prokop A. and Davidson J.M., *J Pharm Sci*, **2008**, 97, 3518.
- Quintanar-Guerrero D., Allemann E., Fessi H., Dolker E., *Drug Dev Ind Pharm*, **1998**, 24, 113.
- Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D., Drews M., Morandi M., Malinski T., Radomski M.W., *Br J Pharmacol*, **2005**, 146, 882.
- Ramaswamy M., Zhang X., Burt H.M., Wasan K.M., *J Pharm Sci*, **1997**, 86, 460.
- Rawat M., Singh D., Saraf S., Saraf S., *Biol Pharm Bull*, **2006**, 29, 1790.
- Rocco M., Bainbridge W., *Societal implications of nanosciences and nanotechnology. National Science Foundation*, March **2001**.

- Rosen G.M., Pou S., Ramos C.L., Cohen M.S., Britigan B.E., *FASEB J*, **1995**, 9, 200.
- Roser M., Fischer D., Kissel T., *Eur J Pharm Biopharm*, **1998**, 46, 255.
- Sahoo S., Pnyam J., Prabha S., Labhasetwar V., *J Controlled release*, **2002**, 82, 104.
- Sant S., Poulin S., Hildgen P., *J Biomed Mater Res A*, **2008**, 87, 885.
- Schwarze S.R., Dowdy S.F., *Trends Pharmacol Sci*, **2000**, 21, 45.
- Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C., Gregoriadis G., *Biochim Biophys Acta*, **1991**, 1062, 77.
- Sharma D., Chelvi T.P., Kaur J., Chakravorty K., De T.K., Maitra A., Ralhan R., *Oncol Res*, **1996**, 8, 281.
- Shenoy D.B., Amiji M.M., *Int J Pharm*, **2005**, 293, 261.
- Shive M.S., Anderson J.M., *Adv Drug Deliv Rev*, **1997**, 28, 5.
- Skiba M., Wouessidjewe D., Puisieux F., Duchène D., Gulik A., *Int J Pharm*, **1996**, 142, 121.
- Smola M., Vandamme T., Sokolowski A., *Int J Nanomedicine* **2008**, 3, 1.
- Sohn Y.T., Oh J.H., *Arch Pharm Res*, **2003**, 26, 1002.
- Srinivasan M., Sudheer A.R., Menon V.P., *J Clin Biochem Nutr*, **2007**, 40, 92.
- Stone V., Johnson G.D., Wilton J.C., Coleman R., Chipman J.K., *Biochem Pharmacol*, **1994**, 47, 625.
- Suzie Hwang Pun and Davis M.E., *Bioconjugate Chem*, **2002**, 13, 630.

- Szocs K., *Gen Physiol Biophys*, **2004**, 23, 265.
- Teng Y., Morrison M.E., Munk P., Webber S.E., *Macromolecules*, **1998**, 31, 3578.
- Tian M., Qin A., Ramireddy C., Webber S.E., Munk P., Tuzar Z., Prochazka K., *Langmuir*, **1993**, 9, 1741.
- Torchilin V.P., *Annu Rev Biomed Eng*, **2006**, 8, 343.
- Torchilin V.P., *Cell Mol Life Sci*, **2004**, 61, 2549.
- Torchilin V.P., *Curr Drug Deliv*, **2005**, 2, 319.
- Torchilin V.P., *J Liposome Res*, **1996**, 6, 99.
- Torchilin V.P., *Pharm Res*, **2007**, 24, 1.
- Torchilin V.P., Shtilman M.I., Trubetskoy V.S., Whiteman K.R., Milstein A.M., *Biochim Biophys Acta*, **1994**, 1195, 181.
- Torchilin V.P., Trubetskoy V.S., *Adv Drug Deliv Rev*, **1995**, 16, 41.
- Torchilin V.P., ed. *Nanoparticulates as Pharmaceutical Carriers*. London, UK, Imperial College Press, **2006**.
- Torchilin V.P., *Nat Rev Drug Discovery*, **2005**, 4, 145.
- Trubetskoy V.S., Gazelle G.S., Wolf G.L., Torchilin V.P., *J Drug Targeting*, **1997**, 4, 381.
- Trubetskoy V.S., Torchilin V.P., *Adv Drug Deliv Rev*, **1995**, 16, 311.
- Umland S.P., Schleimer R.P., Johnston S.L., *Pulm Pharmacol Ther*, **2002**, 15, 35.
- Vermehren C., Jørgensen K., Schiffelers R., Frokjaer S., *Int J Pharm*, **2001**, 214, 93.
- Veronese F.M., Harris J.M., *Adv Drug Deliv Rev*, **2002**, 54, 453.

- Wang Y., Kaush C.M., Chun M., Quirk R.P., Mattice W.L., *Macromolecules*, **1995**, 28, 904
- Wilcox J.B., Avery G.S., *Drugs*, **1973**, 6, 84.
- Woodle M.C., *Chem Phys Lipids*, **1993**, 64, 249.
- Wu M., Gunning W., Ratman M., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **1999**, 8, 775
- Xing L. and Mattice W.L., *Langmuir*, **1998**, 14, 4074.
- Yamaoka T., Tabata T., Ikada Y., *J Pharm Sci*, **1994**, 83, 601.
- Yokoyama M., Miyauchi M., Yamada N., Okano T., Sakurai, Kataoka K., Inoue S., *Cancer Res.*, **1990**, 50, 1693.
- Yoo H.S., Lee K.H., Oh J.E., Park T.G., *J Control Release* **2000**, 3, 419.
- Yu K., Zhang L., Eisenberg A., *Langmuir*, **1996**, 12, 5980.
- Yuan F., Dellian M., Fukumura M., Leunig M., Berk D.A., Torchilin V.P., Jain R.K., *Cancer Res*, **1995**, 55, 3752.
- Zalipsky S., *Adv Drug Deliv Rev*, **1995**, 16, 157.
- Zambaux M., Bonneaux F., Gref R., Dellacherie E., Vigneron C., *J Contr Rel*, **1999**, 60, 179.
- Zeng F, Liu J., *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 1810.
- Zhang L. and Eisenberg A., *Science*, **1995**, 268, 1728.
- Zhang L., Yu K., Eisenberg A., *Science*, **1996**, 272, 1777.
- Zhang X., Burt H.M., Von Hoff D., Dexter D., Mangold G., Degen D., Oktaba A.M., Hunter W.L., *Cancer Chemother Pharmacol*, **1997**, 40, 81.
- Zhang Z., Feng S.S., *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 1139.
- Zhao Z. and Moghadasian M.H., *Food Chemistry*, **2008**, 109, 691.

- Zonneveld L., editor. *Reshaping the human condition: exploring human enhancement. The Hauge: Rethenau Institute; 2008.*